

**Proteolytische Kontrolle des Proteins der
promyelozytischen Leukämie (PML) durch Modifikation
mit dem Ubiquitin-verwandten Protein SUMO**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von
Stefan Rene Weißhaar
aus Bergisch Gladbach

Köln, 2008

Prüfer: Prof. Dr. Thomas Langer,
Institut für Genetik, Zülpicher Strasse 47, 50674 Köln

Koreferent: Prof. Dr. Jürgen Dohmen,
Institut für Genetik, Zülpicher Strasse 47, 50674 Köln

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2008

Zusammenfassung

Das Ubiquitin-verwandte Protein SUMO (*small ubiquitin like modifier*) wird kovalent an viele verschiedene Zielproteine gebunden, darunter auch an das promyelozytische Leukämie (PML) Protein. Die Protein-Modifizierung mit SUMO ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus, der an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist, viele davon auch mit biomedizinischer Relevanz.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Inhibition des Proteasoms und die daraus resultierende Akkumulation von Proteinen in humanen Zellen untersucht, die gleichzeitig mit SUMO und Ubiquitin konjugiert sind. Vorangegangene Studien charakterisierten einen Signalweg in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* der den proteolytischen Abbau von SUMOylierten Proteinen mittels spezifischer Ubiquitin-Ligasen für SUMO-Konjugate (ULS) koordiniert. Die vorliegende Arbeit erbringt den ersten Beweis, dass die Verbindung zwischen dem SUMO- und dem Ubiquitin-Signalweg für den Abbau über das 26S Proteasom von der Hefe bis zum Menschen konserviert vorzufinden ist. Die Ergebnisse implizieren, dass diese proteolytische Kontrolle spezifisch durch Konjugate mit kettenbildenden SUMO2/3-Isomeren vermittelt wird.

Arsentrioxid (ATO) ist ein hochwirksames Medikament in der klinischen Behandlung der akuten promyelozytischen Leukämie (APL), die durch das onkogene PML-RAR α -Fusionsprotein hervorgerufen wird. Das PML-RAR α -Fusionsprotein besteht aus dem N-terminalen Bereich des PML-Proteins und der C-terminalen Region des Retinsäure Rezeptors α (RAR α). Die Behandlung mit ATO führt zum Abbau des PML-RAR α -Fusionproteins, zur Differenzierung der Leukämie-Zellen und zur vollständigen Heilung. Dabei ist der zugrunde liegende Mechanismus dieses Abbaus bisher noch nicht entschlüsselt worden. Hier wird die ATO-induzierte SUMO2/3-Modifikation und die anschließende Ubiquitinierung von PML beschrieben. Damit konnte PML als das erste spezifische Substrat des ULS-vermittelten Abbaus identifiziert werden. Zusätzlich konnten wir RNF4 als das spezifische ULS-Protein für SUMO-modifiziertes PML identifizieren.

Des Weiteren wird in dieser Studie die Etablierung eines *in vitro* und eines *in vivo* SUMOylierungssystems beschrieben. Beide Systeme ermöglichen die unkomplizierte Herstellung von SUMOylierten Substraten, was am Beispiel für PML gezeigt wird. Dieses kann in der Folge für biochemische Studien bezüglich des Einflusses der posttranslationalen SUMO-Modifikation eingesetzt werden.

Abstract

The small ubiquitin-related modifier (SUMO) is covalently attached to many different target proteins, including the promyelocytic leukaemia (PML) protein. The SUMO modification of proteins is an important regulatory mechanism implicated in many cellular processes, including several of biomedical relevance.

In the present thesis the inhibition of the proteasome and resulting accumulation of proteins that are simultaneously conjugated to both SUMO and ubiquitin have been studied in human cells. Previous studies had recognised a pathway that mediates the proteolytic down-regulation of sumoylated proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and that involves the action of specific ubiquitin ligases for SUMO conjugates (ULS). This present work provides first evidence that this connection between SUMO and the ubiquitin pathway to target substrates for the degradation via the 26S proteasome is conserved from yeast to human. The results indicate that in particular conjugates formed by the chain forming SUMO2/3 isoforms are subject to this proteolytic control in human cells.

Arsenic trioxide (ATO) is a powerful drug in the clinical treatment of acute promyelocytic leukaemia (APL) which is caused by the oncogenic PML-RAR α fusion protein consisting of the N-terminal region of the PML protein and the C-terminal region of the retinoic acid receptor α (RAR α). ATO treatment induces the degradation of the PML-RAR α fusion protein, differentiation of leukaemic cells and clinical remission. However, the underlying mechanism of this degradation pathway has remained elusive. Here it is shown that ATO induces the SUMO2/3 modification and subsequent ubiquitylation of PML. Therefore PML is the first described human protein degraded by the ULS pathway and we were able to identify RNF4 as the ULS protein modifying SUMOylated PML with ubiquitin.

Additionally, the establishment of an *in vitro* and an *in vivo* SUMOylation system is reported in this study. Both systems are powerful tools to generate SUMOylated proteins, shown with PML constructs, in order to investigate further biochemical properties of the SUMO-modification in several aspects.

	Zusammenfassung.....	III
	Abstract.....	IV
1	Einleitung	3
1.1	PML-Kerndomänen.....	3
1.1.1	Funktion der PML Kerndomänen.....	5
1.1.2	Struktur und Eigenschaften des PML Proteins.....	9
1.1.3	Bildung der PML-NBs	14
1.1.4	Akute promyelozytische Leukämie - APL	15
1.2	Posttranslationale Modifikation durch Ubiquitin und Ubiquitin-verwandte Proteine (UBL)	20
1.2.1	Ubiquitinierung.....	20
1.2.2	Ubiquitin-verwandte Proteine (UBL).....	22
1.2.3	SUMO.....	22
1.3	Ziel dieser Arbeit.....	29
2	Material und Methoden	30
2.1	Chemikalien und Lösungen.....	30
2.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.2	Reagenzienbaukästen (Kits).....	31
2.1.3	Säulenmaterialien	31
2.1.4	Chemikalien.....	31
2.1.5	Enzyme	32
2.1.6	Plasmide	32
2.1.7	Bakterienstämme	33
2.1.8	Antikörper.....	34
2.1.9	Puffer und Medien.....	35
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.1	Kultivierung von Bakterien	36
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli Bakterien.....	36
2.2.3	Endonukleolytische Spaltung von DNA	37
2.2.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	37
2.2.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	38
2.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
2.2.8	Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	39
2.2.9	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid DNA.....	40
2.2.10	DNA-Sequenzierung	40
2.3	Proteinbiochemische Methoden	41
2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	41
2.3.2	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie	42
2.3.3	Transfer und Immobilisierung von Proteinen (<i>Western-Blot-Analyse</i>)	42
2.3.4	Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine	43
2.3.5	Reinigung von Proteinen	43
2.3.5.1	Expression von Proteinen und Aufschluss der Bakterien.....	43
2.3.5.2	Glutathion-Affinitätschromatographie	44
2.3.5.3	Ionenaustauschchromatographie	45
2.3.5.4	Größenausschlusschromatographie	45
2.3.5.5	Proteinkonzentrierung durch Ultrafiltration	45
2.3.5.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	46
2.3.5.7	Expression und Reinigung von His-Aos1/Uba2 (SUMO E1).....	46
2.3.5.8	Expression und Reinigung von Ubc9 (SUMO E2)	48
2.3.6	<i>In vitro</i> SUMOylierung	49

2.3.7	SUMOylierung mit einem trimeren Vektorsystem	50
2.4	Zellbiologische Methoden	51
2.4.1	Zellkultur	51
2.4.2	Verwendete Zelllinien	51
2.4.3	Kultivierung humaner Zellen	52
2.4.4	Vermehrung humaner Zellen	52
2.4.5	Transfektion kultivierter Zellen	53
2.4.6	Stimulation/ Induktion	53
2.4.7	Zellaufschluss	53
2.4.8	Affinitätsreinigung mit FLAG	54
2.4.9	Affinitätsreinigung mit Ni-NTA	55
3	Ergebnisse	57
3.1	<i>in vitro</i> SUMOylierung	57
3.1.1	Reinigung der einzelnen Komponenten	57
3.1.2	Untersuchung der <i>in vitro</i> SUMOylierung	59
3.2	Darstellung von eukaryotischen SUMO1- oder SUMO2-konjugierten Proteinen in <i>E. coli</i>	64
3.2.1	Expression von <i>in vivo</i> -SUMOylierten Substraten	65
3.3	SUMO-abhängiger Abbau von PML über das 26S Proteasom	66
3.3.1	Auswirkungen der Proteasominhibition auf SUMO-Konjugate in HeLa B- Zellen	67
3.3.2	PML als Substrat für die SUMO2/3-abhängige proteolytische Kontrolle	71
4	Diskussion	83
4.1	<i>In vitro</i> SUMOylierung	83
4.2	<i>In vivo</i> SUMO-Modifikation von Substraten in bakteriellen Expressionssystemen	89
4.3	SUMO abhängiger Abbau von PML über das 26S Proteasom	92
4.3.1	Auswirkungen der Proteasominhibition auf SUMO-Konjugate in humanen Zellen	92
4.3.2	PML ist ein Substrat für die SUMO2/3-abhängige proteolytische Kontrolle	97
5	Literaturverzeichnis	108
6	Abkürzungsverzeichniss	124
7	Danksagung	128
8	Eidesstattliche Erklärung	129
9	Lebenslauf	130

1 Einleitung

1.1 PML-Kerndomänen

Der Zellkern von Säugetierzellen ist ein von der Kernmembran umfasstes Organell das in erster Linie die Erbgutinformationen in Form von DNA (Englisch: *desoxyribonucleic acid*) beinhaltet. Als essentielles Merkmal des Zellkerns ist hier die Maschinerie der Genexpression lokalisiert. Innerhalb des höchst organisierten Zellkerns können verschiedene spezialisierte Domänen oder auch subnukleäre Organellen identifiziert werden (siehe Abb. 1.2.1) (Spector, 2001).

Eine dieser subnukleären Strukturen sind die PML-Kerndomänen (englisch *PML nuclear bodies*, kurz PML-NBs), die in der Literatur auch unter den Namen POD (PML onkogene Domäne), ND10 (nukleäre Domäne 10) oder Kremer-Körper geführt werden. Der Name PML-NBs oder POD stammt von verschiedenen Arbeiten Anfang der 1990er Jahre die zeigten, dass das promyelozytische Leukämie Protein (PML) mit dieser Kerndomäne assoziiert ist. Das PML-Protein wurde zuerst bei Patienten mit akuter promyelozytischer Leukämie (APL) entdeckt, bei denen durch eine Chromosomentranslokation PML mit dem Retinsäure-Rezeptor α (RAR α) fusioniert ist (Ascoli and Maul, 1991; Dyck et al., 1994; Hodges et al., 1998; Koken et al., 1994; Maul et al., 2000; Melnick and Licht, 1999).

Bei den PML-NBs handelt es sich um dynamische Multiproteinkomplexe deren Anzahl in einer typischen Zelle zwischen 10 und 30 liegt die eine Größe von 0,3 – 1 μm aufweisen (Eskiw et al., 2003; Melnick and Licht, 1999). Das PML-Protein spielt bei der Bildung und Integrität der Domäne die essentielle Rolle. Wenn es nicht vorhanden ist, bilden sich keine PML-NBs und alle weiteren Komponenten der PML-NBs zeigen eine verstreute Lokalisierung (Lallemand-Breitenbach et al., 2001; Zhong et al., 2000; Zhu et al., 2001).

Die Anzahl, Größe und Proteinzusammensetzung der PML-NBs ist vom Zelltyp, der Zellzyklusphase und dem Differenzierungsstadium der Zelle abhängig (Dellaire et al., 2006b). Im Vergleich zur G1-Phase lassen sich in der G2-Phase etwa doppelt so viele PML-NBs nachweisen. Das hängt damit zusammen, dass in der S-Phase das Chromatin repliziert wird und durch seine strukturelle Neuordnung die PML-Körper in kleinere Strukturen verteilt werden. Während der Mitose aggregieren die PML-NBs und bestehen

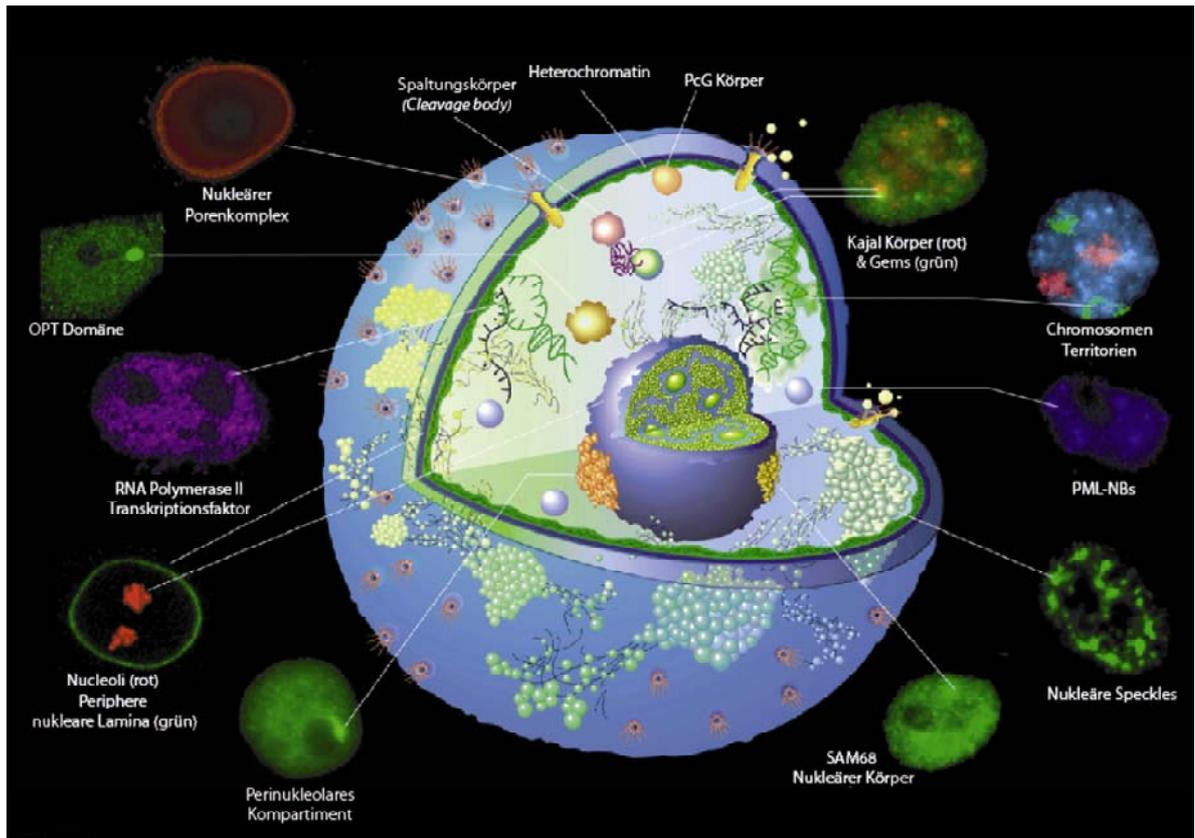


Abb. 1.1.1: Schematische Darstellung des Zellkerns. Die nukleären Domänen werden einmal schematisch und zum anderen als immunofluoreszenzmikroskopisches Bild gezeigt. Blau eingezeichnet sind die PML-NBs zu erkennen (geändert nach (Spector, 2001)).

nur noch aus PML, sodass sie auch als MAPPs (*mitotic accumulations of PML protein*) bezeichnet werden (Dellaire et al., 2006a; Dellaire et al., 2006b).

Generell zeigt sich, dass PML-NBs weder im Gebiet der aktiven Transkription noch der gerade synthetisierten DNA lokalisiert sind, sondern in interchromosomalen Bereichen des Kerns anzutreffen sind, wo sie mit der nukleären Matrix verknüpft sind (Borden, 2002; Maul et al., 2000). PML-NBs kommen oft in der Nähe anderer subnukleärer Domänen vor. Zum einen sind das die fleckenförmigen „Speckles“, die als Speicherort für Spleiß-Proteine dienen, dann die Cajal-Körper, die am Transport und der Reifung von snRNA und snoRNA (*small nuclear/ nucleolar RNA*), sowie der Assemblierung von Transkriptionskomplexen beteiligt sind, und außerdem die Gems (*gemini of Cajal bodies*), die mit den Cajal-Körpern assoziiert sind und ebenfalls eine Rolle bei der Reifung der snRNA spielen (Andrade et al., 1991; Dundr et al., 2000; Matera, 1999). Weder Chromatin noch RNA wurden im Inneren der PML-NBs nachgewiesen, aber neu synthetisierte RNA assoziiert mit der Peripherie dieser Kernkörper (Boisvert et al., 2000). Eine Studie mit Zellen von Patienten mit ICF-Syndrom (*immunodeficiency, centromeric instability and facial dysmorphism*) konnte in der G2-Phase so genannte *Giant* PML-NBs

nachweisen (Luciani et al., 2006). Diese riesigen PML-NBs haben eine Größe von 2-4 μM und beinhalten in ihrem Zentrum Satelliten-DNA. Durch ihre Größe konnte mit Hilfe konfokaler Mikroskopie die Struktur der *Giant* PML-NBs aufgeschlüsselt werden. So sind die Proteine dieser *Giant* PML-NBs, die in ihrer Protein-Zusammensetzung den „normalen“ PML-NBs gleichen, in der G2-Phase in mehreren Lagen um die Satelliten-DNA herum aufgebaut. Außen befindet sich das PML-Protein, dann folgt eine Lage mit CBP (*CREB binding protein*), Sp100 (*Speckled*), BLM (*Blooms syndrome protein*) und TopoIII (Topoisomerase III) und eine weitere Lage mit Daxx (*death associated protein 6*). Die beiden Lagen im Zentrum um die Satelliten-DNA bestehen aus HP1 (Heterochromatin Protein 1) und ATRX (*alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*) (Luciani et al., 2006). In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass neben den *Giant* PML-NBs die „normalen“ PML-NBs während einer kurzen Zeit in der G2-Phase zentromer-nahe Satelliten-DNA-Bereiche beinhalten, aber dass sie weder an telomerischer oder zentromerischer DNA detektiert werden konnten (Luciani et al., 2006). Dadurch wird den PML-NBs eine Funktion bei der Wiederherstellung der kondensierten Heterochromatin-Bereiche um spät replizierte Satelliten-DNA zugesprochen (Luciani et al., 2006).

1.1.1 Funktion der PML Kerndomänen

PML-NBs werden mit vielen verschiedenen Funktionen innerhalb des Zellkerns in Verbindung gebracht (siehe Abb. 1.1.2). Es sollte beachtet werden, dass PML^{-/-} Mäuse lebensfähig sind und im Vergleich zu ihrem wildtypischen Stamm nur eine höhere Anzahl und ein differenzierteres Spektrum an Tumoren ausbilden wenn sie karzinogenen Behandlungen ausgesetzt werden. Das deutet darauf hin, dass PML eine Rolle als Tumorsuppressor spielt (Rego et al., 2001).

Den PML-NBs wird eine Vielzahl von weiteren möglichen Funktionen zugeordnet, da beteiligte Proteine zu bestimmten Zeitpunkten an oder innerhalb der PML-NBs lokalisieren. Laut der *Nuclear Protein Data Base* (<https://npd.hgu.mrc.ac.uk/index.html>) sind bis heute 78 Proteine aufgelistet, die an den PML-NBs lokalisieren. Diese Proteine, die in regulatorischen Prozessen wie der antiviralen Antwort, der Apoptose, der Seneszenz, der Proteolyse, der DNA Reparatur, der Tumorsuppression und der Genregulation involviert sind, können zeitweise im Bereich der PML-NBs nachgewiesen werden (siehe Abb. 1.1.2) (Bernardi and Pandolfi, 2007; Dellaire and Bazett-Jones, 2004, 2007). Schlussfolgernd wird den PML-NBs ein Einfluss auf diese diversen Funktionen

zugesprochen. Dabei ist zu beachten, dass viele dieser Proteine nur mit einer bestimmten Klasse von PML-NBs interagieren oder erst unter Stressbedingungen (z.B. virale Infektionen oder DNA-Schäden) an diesen Domänen lokalisieren. Auch können bestimmte Proteine sowohl innerhalb der PML-NBs wie auch im gesamten Nukleoplasma verteilt nachgewiesen werden (Dellaire and Bazett-Jones, 2004).

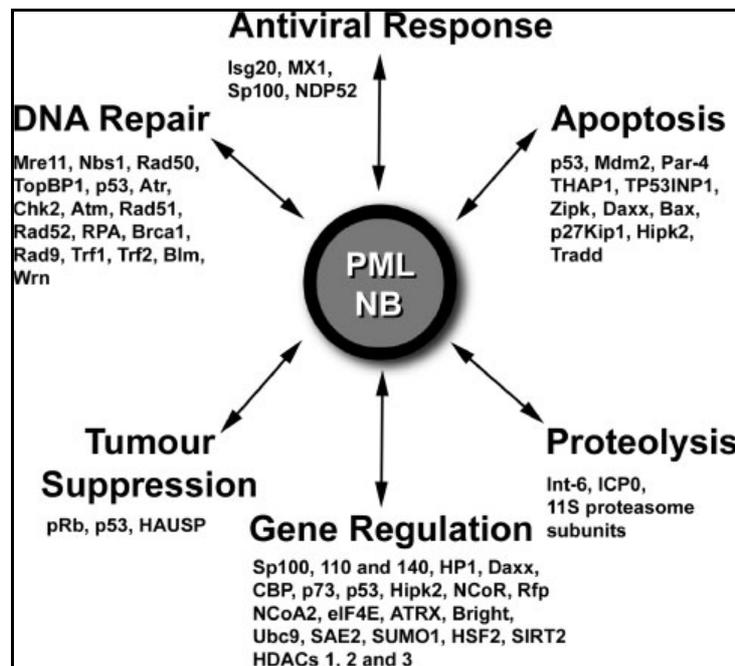


Abb. 1.1.2: Funktionen von PML-NBs: Auflistung von verschiedenen Proteinen, die mit PML-NBs assoziieren. PML-NBs werden so indirekt mit verschiedenen zellulären Prozessen in Verbindung gebracht (Dellaire and Bazett-Jones, 2004).

In der Folge werden die wichtigsten Beispiele für die Beteiligung von PML-NBs in regulatorischen Prozessen aufgegriffen und kurz erläutert:

PML-NBs werden eine mögliche Rolle bei der RNA (*ribonucleic acid*) Prozessierung zugesprochen (Borden, 2002). Sie werden oft in der Nähe von Cajal-Körpern, den *Cleavage Bodies* und den Spleiß-*Speckles* identifiziert. Eine Studie mit T24-Zellen (humane Blasen-Karzinom Zelllinie) konnte nachweisen, dass zumindest einer der bis zu vier pro Zellkern vorkommenden Cajal-Körper direkt an PML-NBs angelagert ist (Grande et al., 1996). Bei der zellulären Antwort auf verschiedene Stressfaktoren (Hitze, Schwermetalle, Produktion von bestimmten viralen Proteinen (z.B. E1A der Adenoviren)) wurde beobachtet, dass PML-NBs zerfallen. Dabei spalten sich von den PML-NBs kleinere Fragmente ab und die Zahl der PML-NBs steigt an. Während die parentalen PML-NBs ihre Position nicht verändern und ihre Proteinzusammensetzung durch eine erhöhte Konzentration von SUMO1 (*small ubiquitin related modifier 1*) und Sp100 charakterisiert

wird, besitzen die sehr mobilen kleineren Fragmente keines dieser beiden Proteine mehr (Eskiw et al., 2003). Dieser Prozess ist SUMO1-abhängig, da Überexpression von SUMO1 das Zerfallen der PML-NBs nach Hitzestress verhindern kann (Eskiw et al., 2003).

Andererseits führt DNA-Beschädigung (z.B. durch exogene Nukleasen) zwar auch zu einer Disassemblierung der PML-NBs in kleinere Fragmente, die so genannten PML *Microbodies*, die aber weiterhin SUMO1 und Sp100 beinhalten. Auch unterscheiden sich diese PML *Microbodies* von den durch Hitzeschock entstandenen Fragmenten dadurch, dass ihre Bildung nicht durch SUMO1 Überexpression inhibiert werden kann. Dieser Prozess der SUMO1 unabhängigen Disassemblierung kann auch durch andere Störungen der Chromatin Struktur hervorgerufen werden, z.B. Induktion von Apoptose (durch Staurosporin) oder Inhibition der Transkription (durch Actinomycin D) (Eskiw et al., 2004).

Eine Verbindung der PML-NBs zum angeborenen Immunsystem existiert ebenfalls. Auf Interferon- γ (IFN γ) Stimulation reagiert eine Zelle mit einer erhöhten Expression von wichtigen Komponenten dieser Kerndomäne. Allen voran wird das PML-Proteins selbst, aber auch z. B. Sp100 vermehrt exprimiert. Im Verlauf einer IFN γ Stimulation nehmen letztendlich PML-NBs an Größe und Anzahl zu (Guldner et al., 1992; Lavau et al., 1995). Des Weiteren zeigen Infektionen der Zelle mit verschiedenen DNA- und RNA-Viren, dass PML-NBs beeinflusst werden, wobei sie entweder ganz zerstört oder ihre Zusammensetzung und Morphologie verändert wird (Carvalho et al., 1995; Chelbi-Alix and de The, 1999; Everett et al., 1998). Roger Everett fasste in einer Veröffentlichung folgende Zusammenhänge zwischen DNA-Viren und PML zusammen: I. Die parentalen Vireng Genome und/oder die Replikationsmaschinerie, die den Ort der viralen Replikation innerhalb des Zellkerns definieren, sind mit den PML-NBs eng assoziiert. II. Größere DNA-Viren kodieren auch für regulatorische Proteine (Adenovirus E4orf3 und Herpesvirus ICPO), die an die PML-NBs lokalisieren und deren Struktur verändern oder zerstören. III. Die Zerstörung der PML-NBs durch regulatorische Proteine des Herpesvirus führen zu einer vermehrten viralen Genexpression (Everett and Chelbi-Alix, 2007). Diese und andere Beobachtungen bestärken die Hypothese, dass PML, PML-NBs und andere in diesen Strukturen befindlichen Proteine an antiviralen Abwehrmechanismen beteiligt sind (Everett and Chelbi-Alix, 2007).

Verschiedene Experimente haben gezeigt, dass eine Überexpression durch transfiziertes PML in verschiedenen Zelllinien zu einem Anstieg der Apoptose führen kann, was darauf schließen lässt, dass PML als proapoptotischer Faktor fungieren kann

(Borden et al., 1997; Quignon et al., 1998). Die Überexpression von PML kann aber auch Zellen zum Eintritt in die zelluläre Seneszenz führen. Gegenteilig verhindert eine RNAi-vermittelte Abreicherung von PML eben diesen Eintritt in die Seneszenz (Ferbeyre et al., 2000; Pearson et al., 2000). Bei der Seneszenz bilden sich Heterochromatinbereiche, in denen die Transkription eingestellt ist. Dafür verantwortlich ist der SAHF-Komplex (*senescence-associated heterochromatin foci*), der durch Hypoacetylierung, Methylierung des Lysins 9 von Histon H3 und der Anwesenheit des Heterochromatinproteins HP1 charakterisiert wird. Für die Ausbildung dieses SAHF muss HP1 zuvor an den PML-NBs lokalisieren (Zhang et al., 2005).

Eine aktuelle Studie geht davon aus, dass die Strukturen der PML-NBs einen dynamischen Rahmen für einen Wandel der funktionellen Organisation des Zellkerns bilden, der während des Zellzyklus oder als Antwort auf externe Signale die biochemischen Aktivitäten von Chromatin unterstützt oder durchführt (Lancot et al., 2007).

In zwei Studien der Arbeitsgruppe von Pierre Paolo Pandolfi, die erst kürzlich veröffentlicht wurden, konnte für PML-NBs weitere wichtige Rollen im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen festgestellt werden (Ito et al., 2008; Song et al., 2008). Zum einen wurde nachgewiesen, dass PML-NBs eine unverzichtbare Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhezustandes von Leukämie-initiierenden Zellen (LICs *leukaemia-initiating cells*) spielt. Es wurde gezeigt, dass das Fehlen von PML einen progressiven Verlust der Funktion von blutbildenden Stammzellen (HSC haematopoietic stem cells) auslöst, als Folge eines Defekts bei der Aufrechterhaltung deren Ruhezustandes. Da LICs, die chronische myeloide Leukämien (CML) auslösen können und aufgrund ihres Ruhezustandes in Patienten nicht von den gesunden HSCs unterschieden werden können, sind sie resistent gegen eine chemotherapeutische Behandlung. PML-defiziente LICs dagegen werden über die Zeit abgebaut und verlieren die Fähigkeit CML in transplantierten Mäusen zu generieren. Deshalb kann eine Therapie, die zum Abbau von PML in den Zellen führt, helfen einen weiteren Ausbruch bei CML-Patienten zu verhindern. Dafür in Frage käme eine Behandlung mit ATO (Arsentrioxid), die zu einem Abbau von PML führt (siehe Abschnitt 1.1.4) (Ito et al., 2008). Die zweite aktuelle Veröffentlichung der Arbeitsgruppe von Dr. Pandolfi beschäftigt sich mit der Rolle von PML-NBs bei der Lokalisation des Tumorsuppressors PTEN (*phosphate and tensin homologue deleted in Chromosome 10*) (Song et al., 2008). PML wirkt in diesem Zusammenhang zusammen mit Daxx der deUbiquitinierung von PTEN durch HAUSP

(*herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease*) entgegen, die für eine extranukleäre Lokalisation PTENs sorgt, die in verschiedenen Krebsarten (z.B. Prostatakrebs) zu beobachten ist. Dadurch kann PTEN seine normale nukleäre Lokalisation wiedererlangen (Song et al., 2008).

Generell ist es aufgrund der funktionellen Heterogenität schwierig ist, den PML-NBs eine einzelne Funktion zuzusprechen (Bernardi and Pandolfi, 2007; Borden, 2002). Es könnte sein, dass die PML-NBs in den besprochenen Prozessen beteiligt sind, indem sie die Chromatinstruktur anpassen, die Transkription bestimmter Gene regulieren, die Anreicherung von nukleären Proteinen und/oder der Vermittlung von posttranskriptionellen Modifikationen von spezifischen Zielproteinen vermitteln (Bernardi and Pandolfi, 2007). Verschiedene zelluläre Stresse, die Expression, Modifikation und Lokalisation von PML verändern, führen dazu, dass neue Möglichkeiten für die Interaktion der PML-NBs entstehen. Alle diese kombinierten Faktoren bestimmen die Funktion der PML-NBs. Weitere Forschungen müssen erfolgen, um die direkte Funktion dieser komplexen PML-NBs aufzuschlüsseln.

1.1.2 Struktur und Eigenschaften des PML Proteins

Wie in Abschnitt 1.1.1 erwähnt, wurde das PML-Gen als Fusionspartner des Retinsäure Rezeptors α (RAR α) Gens durch die t(15;17) Chromosomentranslokation in APL Patienten entdeckt (Borrow et al., 1990; de The et al., 1990). Das PML-Gen auf Chromosom 15 im Menschen besteht aus 9 Exons, die auf einem Bereich von ca. 35 kb verteilt liegen. (Fagioli et al., 1992) Die Exons 5 bis 9 können alternativ gespleißt werden (siehe Abb. 1.1.3) und führen daher zu einer hohen Anzahl von Isoformen (Jensen et al., 2001). Die Expression des PML-Gens wird stark durch IFN (Stadler et al., 1995) oder TP53-Aktivierung (de Stanchina et al., 2004) induziert. Eine gewebespezifische Expression von verschiedenen PML-Isoformen wurde in myeloiden Zelllinien und in Endothelzellen nachgewiesen (Daniel et al., 1993; Flenghi et al., 1995). Auch Entzündungen oder onkogene Transformation führen zu einer starken PML-Expression *in vivo* (Koken et al., 1995; Terris et al., 1995). In Verbindung mit verschiedenartigen Tumoren konnte gezeigt werden, dass die Tumorprogression mit einem Verlust der PML-Expression einhergeht (Gurrieri et al., 2004).

PML gehört zur Familie der 77 (NCBI) humanen RBCC/TRIM Proteine (RING *finger* B-box, *coiledcoil/ tripartite motif* (Reymond et al., 2001)) und wird auch unter dem Namen

TRIM 19 geführt (Nisole et al., 2005). Das RBCC/*tripartite*-Motiv wird von den Exons 1-3 für jede der 11 bekannten Isoformen von PML kodiert (Abbildung 1.1.3) (Condemine et al., 2006). Das RBCC-Motiv besteht aus drei verschiedenen Domärentypen (siehe Abb. 1.1.4). Die erste Domäne ist der RING (*really interesting new gene*)-Zink-Finger. Dieser RING-Zink-Finger des Typs C3HC4 ist eine 40-60 Aminosäure (aa = *aminoacids*) große Domäne (in PML von aa 57-91), die zwei Zinkatome bindet und der zumeist eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen zugesprochen wird, darunter Interaktionen mit E2-Enzymen (Duprez et al., 1999; Nisole et al., 2005). Mutationen der Cysteine des RING Fingers, die an der Bindung der Zn^{2+} -Atome beteiligt sind, führen bei PML zu einem Verlust der Lokalisierung in PML-NBs und der biologischen Aktivität als Wachstumssuppressors (Borden et al., 1996; Le et al., 1996).

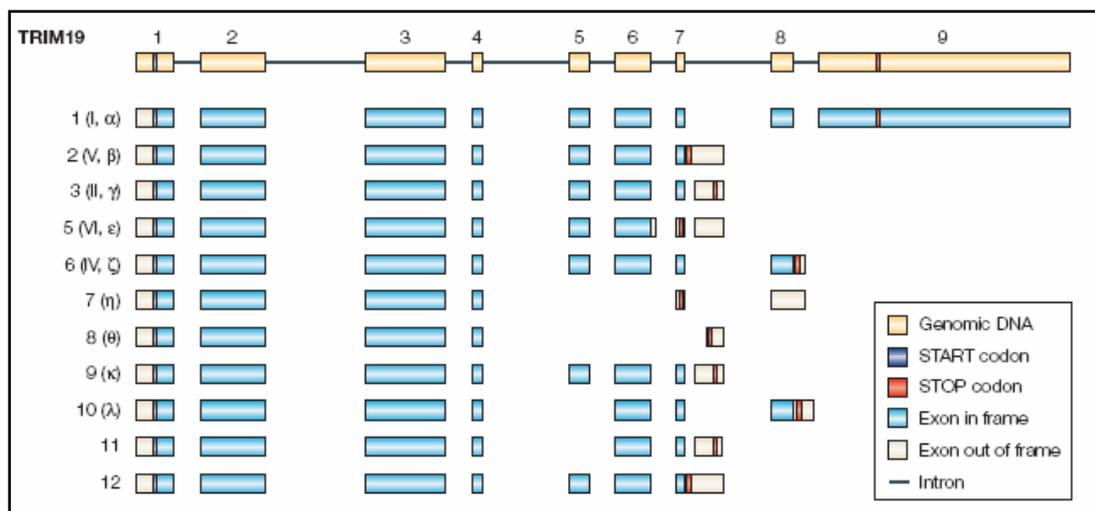


Abb. 1.1.3: PML-Genstruktur. Schematische Darstellung des transkribierten Bereichs des PML Gens und der 11 bekannten Isoformen, deren Transkripte durch alternatives Spleißen erzeugt werden (Nisole et al., 2005).

Die B-Box Domäne, bei PML bestehend aus einer B-Box 1 (B1, aa 140-161) und einer B-Box 2 (B2, aa 189-222), kommt nur in der TRIM Familie vor. Es sind Zink-Finger Domänen des Typs CHC3H2, die ebenfalls zwei Zinkatome binden, die aus ca. 40 aa zusammengesetzt sind und denen bis heute noch keine eindeutige Funktion zugewiesen werden konnte. Einzig führte eine Cystein Mutation innerhalb der B1 oder B2 in PML zum Verlust der Bildung von PML-NB (Borden et al., 1996; Nisole et al., 2005).

Das dritte Element des RBCC Motivs in PML ist das *Coiled Coil* (aa 229-360), eine Hypersekundärstruktur die aus ineinander gewundenen α -Helices besteht. Diese Region innerhalb des PML Proteins ist für die Oligomerisierung von PML und die Heterodimerisierung mit PML-RAR α verantwortlich, wodurch letztendlich die

Differenzierung in den Promyelozyten bei APL-Patienten blockiert wird (Grignani et al., 1996; Melnick and Licht, 1999).

Für einige andere RBCC/TRIM Familienmitglieder konnte spezifisch eine E3 Ubiquitin Ligase- Aktivität (siehe Kapitel 1.2.1) nachgewiesen werden (gezeigt für TRIM5 δ , TRIM18/MID1, TRIM25/Efp, TRIM32/HT2a, TRIM35/ARD1) (Duprez et al., 1999; Niikura et al., 2003; Uchida et al., 2004; Urano et al., 2002).

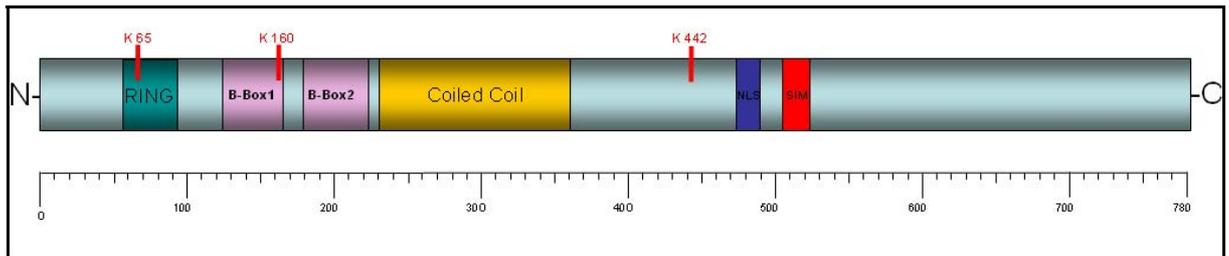


Abb. 1.1.4: PML Proteinstruktur. Schematische Darstellung der 781 aa großen Isoform PML11. Der N-terminale Bereich, der für alle Isoformen gleich ist, umfasst die Domänen des RBCC/TRIM Motivs. Weiter sind die drei SUMOylierungsstellen (K65, K160 und K442) gezeigt. Im Bereich um die aa 500 sind das NLS (in blau) und das SIM (SUMO-Interaktionsmotiv) (in rot) eingetragen

Auf dem PML-Gen befindet sich im Exon 6 das Nukleäre Lokalisations-Signal (NLS), das in den zwei zytoplasmatischen PML-Isoformen (PML 7 und PML 8, siehe Abb. 1.1.3) fehlt (Lin et al., 2004; Nisole et al., 2005). Im Bereich des Exon 7 befindet sich ein SUMO-Interaktionsmotiv (SIM) der Form VVVI, das nicht-kovalent mit SUMO wechselwirken kann (Bernardi and Pandolfi, 2007). PML besitzt darüber hinaus drei SUMOylierungsstellen, Lysine an denen SUMO kovalent gebunden werden kann. Die erste Stelle liegt in der RING Domäne (K65), die zweite in der B1 (K160) und die dritte in der Nähe der NLS an Position K442 (bzw. K490, je nach Isoform) (Condemine et al., 2006).

Das PML-Gen und damit die PML-NBs wurden bisher evolutionär konserviert nur in höheren Eukaryoten nachgewiesen. Zu den Spezies, bei denen das Gen nicht vorzufinden ist gehören die Sprosshefe *Saccharomyces cerevisiae*, die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*, die Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* und die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Borden, 2002). Beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* konnten keine PML-Körper gefunden werden. Ob das PML-Gen im Froschgenom vorhanden ist, kann erst mit der vollständigen Sequenzierung des Genoms ermittelt werden. Im Genom des Huhns *Gallus gallus* kann das PML-Gen dagegen nachgewiesen werden (NCBI).

Wie schon zuvor erwähnt vermittelt der in den Isoformen konservierte N-terminale Bereich die Homomultimerisierung. Dagegen scheint der variable C-terminale Bereich die

Interaktion zu anderen Proteinen zu bestimmen. Im Menschen variiert der C-terminale Bereich der verschiedenen Isoformen sehr stark. In der Maus werden nur zwei fast identische Isoformen exprimiert, somit deutet dies darauf hin, dass gerade hier eine evolutionäre Diversifikation in der jüngeren Evolutionsgeschichte stattgefunden hat (Salomoni et al., 2008). Die Expression einer begrenzten Anzahl von PML-Spleißvarianten in Mäusen im Vergleich zu den vielen verschiedenen Varianten im Menschen könnte dafür sprechen, dass das PML Protein evolutionär eine immer spezialisierter Rolle in der Regulation zellulärer Stresssignalwege eingenommen hat (Condemine et al., 2006). In den meisten Publikationen die sich mit den PML-Isoformen beschäftigen, werden nur 7 Mitglieder genannt, wobei die Nomenklatur oft unterschiedlich ist. Tabelle 1.1.1 soll einen Überblick über die verschiedenen Isoformen und ihre alternative Namensgebung zusammenfassen, wobei die Einordnung auf die 11 bekannten cDNA-Klone gründet, die bei NCBI aufgeführt sind (NCBI).

Name	Protein ID	Länge	Alternative Namen	kDa:
hPML1	NP_150241	882 aa	PML I ¹ ; TRIM19 alpha ² ;	97,516
hPML2	NP_150243	611 aa	PML V ¹ ; TRIM19 beta ² ;	67,445
hPML3	NP_150245	824 aa	PML II ¹ ; TRIM19 gamma ² ;	90,227
hPML4	-			
hPML5	NP_150247	560 aa	PMLVI ¹ ; TRIM19 epsilon ² ;	61,981
hPML6	NP_002666	633 aa	PML IV ¹ ; TRIM19 zeta ² ; PML3 ³	70,023
hPML7	NP_150249	423 aa	PMLVIb ¹ ; TRIM iota v eta ² ;	47,574
hPML8	NP_150250	435 aa	PML VIIb ¹ ; TRIM 19 theta ² ;	48,583
hPML9	NP_150242	829 aa	PML II ¹ ;	90,721
hPML10	NP_150252	585 aa	PMLIVa ¹ ; TRIM19 lambda ² ;	65,036
hPML11	NP_150253	781 aa		85,746
hPML12	NP_150248	611 aa	PML V ¹ ; PML1; PML-2; TRIM19 beta ² ;	67,445
PML III	AAB19601	641 aa	PML III ¹ ; PML-L ³	70,368

Tab. 1.1.1: Auflistung der 11 PML Isoformen. Angegeben werden Name, Protein ID, Länge, alternative Namen aus verschiedenen Veröffentlichungen (¹: (Jensen et al., 2001) ²: (Nisole et al., 2005) ³:(Fogal et al., 2000)) und die Massenangabe der jeweiligen Isoform (NCBI).

PML1 weist die höchste Homologie zu den Mausisoformen auf. Es besitzt als einzige Isoform eine 300 aa lange C-terminale Region, die eine Exonuklease-Domäne (EXOIII) und ein nukleäres Export-Signal (NES) trägt, das gemeinsam mit der NLS zum Pendeln zwischen Nukleus und Zytoplasma befähigt. PML1 scheint wegen der Homologien die älteste Isoform zu sein und besitzt auch die höchste Expressionsrate der verschiedenen PML Isoformen in primären Zellen und in Zelllinien (Condemine et al., 2006). Daher wird

PML1 die Schlüsselrolle bei der Ausbildung der PML-NBs zugesprochen, die EXOIII Domäne könnte eine wichtige Rolle bei der Chromatinbindung und –umgestaltung und für die Interaktion mit Nukleinsäuren spielen (Block et al., 2006; Luciani et al., 2006). Dafür spricht, dass verschiedene Gruppen für PML eine direkte Kontrolle der Genexpression durch die Assoziation z.B. im MHC- Genlocus (*Major Histocompatibility Comple*) gezeigt haben (Kumar et al., 2007; Shiels et al., 2001).

Da es keine Kristallstrukturen der PML-Isoformen gibt können nur Voraussagen über die allgemeine Struktur der C-terminalen Bereiche gemacht werden. Man kann davon ausgehen, dass, mit Ausnahme der EXOIII-Domäne von PML1, diese Bereiche relativ unstrukturiert sind. Das wiederum spiegelt sich in der Vielschichtigkeit der Interaktionen wieder, die PML eingehen kann. Viele Proteine die eine Rolle in Protein/Protein oder Protein/DNA-Interaktionen innehaben weisen von Natur aus unstrukturiertere und ungeordnetere Regionen auf (Dunker et al., 2005). Etwa 40 % der humanen Proteine besitzen solche Regionen und der Anteil bei Proteinen, die bei der transkriptionellen Regulation oder bei Zellsignalwegen involviert sind, ist sogar noch höher. Eine strukturelle Flexibilität ist bei Proteininteraktionen von Vorteil, weil ungeordnete Polypeptide z.B. schneller und mit einer größeren Auswahl von Bindungspartnern interagieren können als starre globuläre Protein-Domänen, was auf die C-terminalen Bereiche von PML zutrifft (Dunker et al., 2005; Salomoni et al., 2008).

Die Hypothese, dass individuelle PML-Isoformen verschiedene Aufgaben besitzen, wird von der wachsenden Anzahl an identifizierten Isoform-spezifischen Protein/Protein-Interaktionen bestätigt. Der C-Terminus von PML1 ist verantwortlich für die Interaktion mit dem Nukleolus, wobei nicht gezeigt werden konnte welche Rolle diese dort spielt (Condemine et al., 2007). Für PML3 wurde gezeigt, dass es spezifisch mit dem adenoviralen Protein E4 Orf3 interagiert (Hoppe et al., 2006). PML6 interagiert spezifisch mit hypophosphoryliertem Retinoblastoma Protein (pRB), mit HDACs (Histondeacetylasen) und mit p53. Außerdem wird dieser Isoform wird eine spezifische Rolle bei der Seneszenz zugesprochen (Alcalay et al., 1998; Bischof et al., 2002; Fogal et al., 2000; Guo et al., 2000; Wu et al., 2001). Die zytoplasmatische Isoform PML8 wird mit dem TGF β (*transforming growth factor*)-Signaltransduktionsweg durch direkte Interaktionen mit SMAD2 (Abkürzung zusammengesetzt aus humanen SPA (*spinal muscular atrophy genes*) und dem Mausgen Mad (*mothers against decapentaplegic*)) und SARA (*Smad anchor for receptor activation*) in Verbindung gebracht (Lin et al., 2004).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt ein unterschiedliches Verhalten von einzelnen PML-Isoformen bezüglich ihrer Retention in PML-NBs (Weidtkamp-Peters et al., 2008). Alle sechs untersuchten Isoformen (PML1, PML2, PML3, PML III, PML6 und PML7 (siehe Tabelle 1.1.1)) weisen individuelle Unterschiede bei der Austauschrate mit den PML-NBs auf. Dabei weist das relativ kurze PML2 (611 aa) die mit Abstand längste Zeit des Verbleibs (durchschnittlich 48 Minuten) in den PML-NBs auf, was darauf schließen lässt, dass sie als Gerüst der PML-NBs dienen könnte. Als Ergebnis ihrer Studien postulieren Weidtkamp-Peters und Kollegen, dass die Subpopulationen aller PML-Isoformen innerhalb der Kernkörper als dreidimensionale Netzwerkstruktur heterooligomerisierter PML-Isoformen aufgebaut sind, wobei PML2 als langfristige aber nicht statische Komponente das Grundgerüst bildet. Ein solches metastabiles PML-NB-Gerüst hätte den Vorteil, dass es sehr rasch auf externe Stimuli antworten könnte. Aber zeitgleich könnte es auch eine stabile Plattform für den Aufbau von funktionellen Komplexen darstellen, die aus sehr schnell austauschbaren Molekülen, wie Daxx, BLM, Hipk2 (*homeodomain interacting protein kinase 2*) oder CBP, mit einer hohen Umsatzrate (wenige Sekunden), aufgebaut sind (Weidtkamp-Peters et al., 2008).

1.1.3 Bildung der PML-NBs

Für die Ausbildung der PML-NBs wird, wie bereits erwähnt, das PML Protein benötigt. Wichtig für den Aufbau der PML-NBs ist dabei, dass das PML Protein posttranslational mit dem Ubiquitin verwandten Protein (*ubiquitin-like protein* = UBL) SUMO1 kovalent modifiziert wird. Die SUMO1-Modifikation von PML, wie auch von Sp100, scheinen eine Schlüsselfunktion bei der dynamischen Protein-Lokalisation innerhalb der PML-NBs einzunehmen (Borden, 2002). Erst die SUMOylierung von PML ermöglicht die Akkumulation von assoziierten Proteinen wie Daxx oder Sp100 (Zhong et al., 2000). *In vitro* ist PML alleine in der Lage Aggregate auszubilden, die PML-NB ähneln. Grundvoraussetzung hierfür ist die zusätzliche Modifikation durch SUMO1, die PML befähigt auch mit anderen Proteinen zu interagieren (Kentsis et al., 2002).

Neben SUMO1 sind bis jetzt erst drei Proteine beschrieben worden die direkt mit PML interagieren: das SUMO-E2 Ubc9 (*ubiquitin conjugating enzyme*), der eukaryotische Translations Initiation Faktor 4E (eIF4E) und das prolinreiche Homeodomänen-Protein (PRH) (Boddy et al., 1996; Cohen et al., 2001; Duprez et al., 1999; Lai and Borden, 2000).

Da neben PML auch andere PML-NB-assoziierte Proteine ein SIM aufweisen und/oder SUMOyliert werden können, darunter Daxx und Sp100 (Song et al., 2004), können über die SUMO-Modifikation mehrere Proteine miteinander interagieren. Die Arbeitsgruppe von Dr. Pandolfi entwarf auf dieser Grundlage eine Theorie zur Bildung der PML-NB durch Dimerisierung von PML über die RBCC/TRIM Domäne als Grundgerüst und zusätzlich über die SIM und die SUMO-Modifikation (siehe Abb. 1.1.5) von PML-NB-assoziierten Proteinen (Shen et al., 2006).

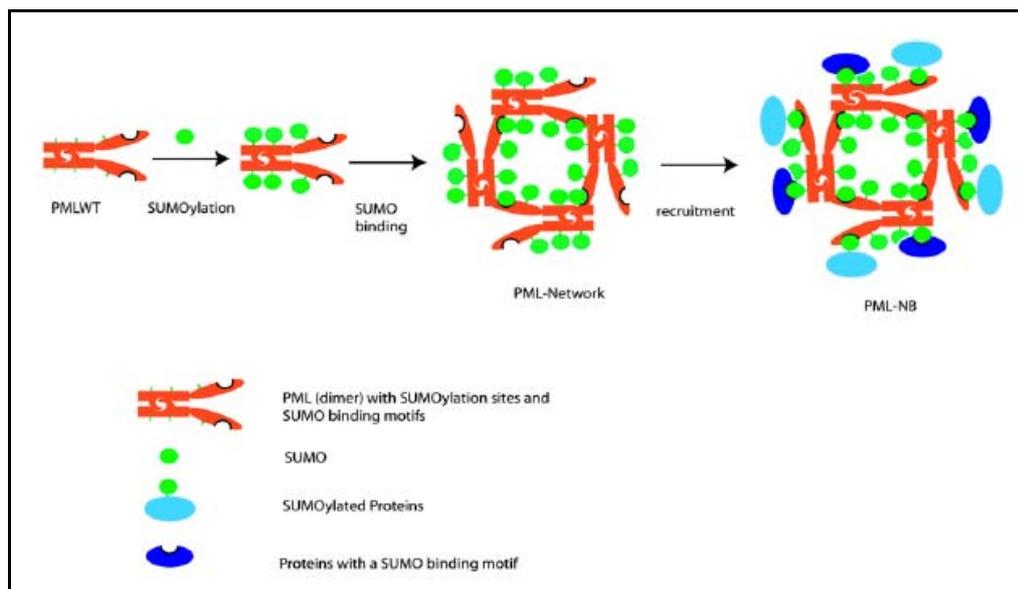


Abb. 1.1.5: Modell der PML-NB-Bildung. Während der Mitose aggregiert PML, nach deSUMOylierung, zu so genannten homogenen MAPPs (mitotic accumulations of PML protein), hier gezeigt als PML Dimere, die über das RBCC-Motiv vermittelt, verbunden sind. In der Interphase folgt dann, nachdem PML und weitere assoziierte Proteine SUMOyliert wurden, eine Rekrutierung von Proteinen (z.B. Daxx oder Sp100), deren Einbindung in die PML-NBs durch konjugiertes SUMO und die SIMs (hier als SBM (*SUMO binding domain*) aufgeführt) sowie durch die RBCC Domäne vermittelt wird (Shen et al., 2006).

1.1.4 Akute promyelozytische Leukämie - APL

Wie bereits erwähnt, wurde PML im Zusammenhang mit der Krankheit akute promyelozytische Leukämie (APL) entdeckt, die als Unterart der akuten myeloischen Leukämien (AML) mit einem Anteil von 10- 15 % jährlich bei mehreren tausend Menschen weltweit auftritt (Zhou et al., 2005). Promyelozyten sind Granula-enhaltende Knochenmarkszellen, die ein Zwischenstadium der Entwicklung von Myeloblasten und Myelozyten zu Granulozyten darstellen. Leukämien sind allgemein eine heterogene Gruppe maligner Erkrankungen der hämopoetischen Zellen, die eine monoklonale Ursache besitzen, d.h. das Leukämie-induzierende Ereignis lässt sich auf die krebserregende

Transformation einer Zelle zurückführen. APL wird durch drei Eigenschaften charakterisiert (siehe Abb. 1.1.6).

Das PML-RAR α -Fusionsprotein stört den ATRA-vermittelten Signaltransduktionsweg. Retinoide, zu denen die Retinsäure zählt, sind ausschlaggebend für die normale Differenzierung myeloider Zellen und fungieren über die Bindung an RARs (*retinoic acid receptors*) oder RXRs (*retinoid x receptors*). Diese Liganden-induzierbaren Transkriptionsfaktoren gehören zur Familie der nukleären Steroid/Thyroid/Retinoid-Rezeptor Superfamilie (Zhou et al., 2005). In APL-Patienten bindet das PML-RAR α -Fusionsprotein zum einen als Homodimer an Genbereiche, die unter normalen Umständen nicht zu den Zielgenen gehören. Darüber hinaus bindet PML-RAR α als Homodimer oder als Heterodimer mit RXR an RAR α -Zielgene, die ein RARE (*retinoic acid response elements*) besitzen, wo es das wildtypische RAR α verdrängt. Als drittes Merkmal führen die Anhäufungen von PML-RAR α in APL-Zellen zur Anreicherung von RXR und/oder anderen RAR α -Kofaktoren in neu gebildeten nukleären und/oder zytoplasmatischen Kompartimenten. Unter den angereicherten Proteinen befindet sich auch das wildtypische

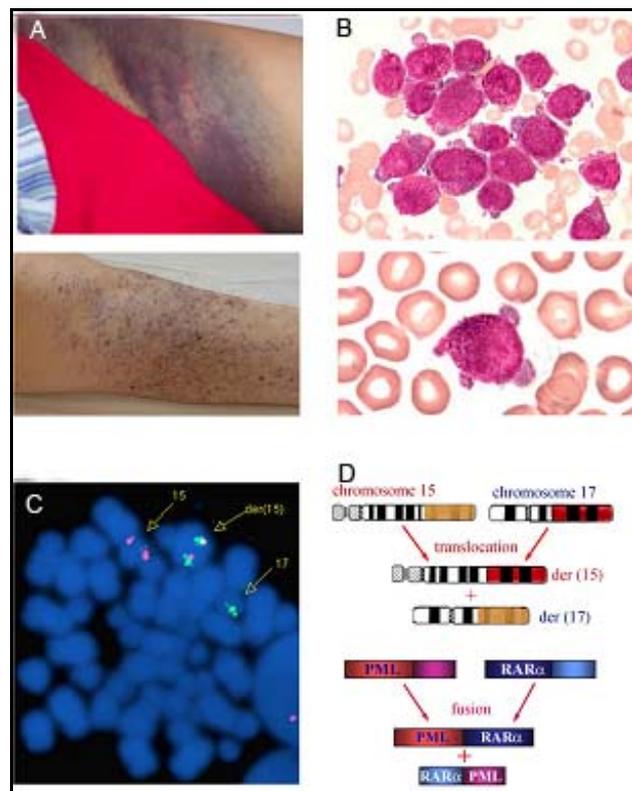


Abb. 1.1.6: Die drei Merkmale von APL: (A) Patienten, die wegen eines erhöhten Fibrinogengehaltes im Blut und wegen einer ausstreuenden intravaskulären Gerinnung eine schwerwiegende Blutungstendenz aufweisen. (B) Akkumulation von abnormalen Promyelozyten im Knochenmark (oben) und im peripheren Blut (unten). (C) Detektion der Translokation t(15;17) durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisation. (D) Schematische Darstellung der reziproken 15;17 Chromosomentranslokation (oben) und der Fusionstranskripte (unten). Verändert nach (Wang and Chen, 2008; Zhou et al., 2005).

PML, so dass zum einen der PML/p53 gesteuerte apoptotische Signalweg inhibiert wird und zum anderen weitere Proteine der PML-NBs delokalisieren. Somit wird die PML-NB-Bildung unterbunden (Melnick and Licht, 1999; Zhou et al., 2005). Insgesamt resultiert daraus eine Blockierung der Differenzierung von frühen myeloischen Vorläuferzellen. Diese proliferierenden hämopoetischen Vorläuferzellen reichern sich stark im Knochenmark und im peripheren Blut an. Die APL-Erkrankung ist die bösartigste Form der akuten Leukämien, da hier die Verdrängung der normalen Blutbildung im Knochenmark zu einer hämopoetischen Insuffizienz führt, die mit Granulozytopenie, Anämie und Thrombopenie einhergeht und ohne Behandlung innerhalb weniger Wochen zum Tode führt (Wang and Chen, 2008; Zhou et al., 2005).

Heute ist APL eine Krankheit, die durch spezifische Behandlungen mit einer hohen Überlebensrate geheilt werden kann. In der Vergangenheit wurde diese Krebsart mit klassischer Chemotherapie behandelt mit dem Ziel, die sich schnell teilenden malignen Zellen zu zerstören. Dabei konnten lediglich 75-80 % der frisch diagnostizierten Patienten auf einen vollständigen Rückgang der Krankheit hoffen. Die Krankheit trat aber in relativ kurzer Zeit (im Mittel nach 11-25 Monate) wieder auf und eine tatsächliche Heilung trat nur bei 35 – 45 % der Patienten ein. Als alternativer Weg wurde die Heilung durch die Differenzierung der malignen Promyelozyten angestrebt. In den frühen 1980er Jahren wurde begonnen, die Patienten mit ATRA (*all-trans* Retinsäure) zu behandeln. Der vollständige Rückgang der Krankheit steigerte sich so auf 90-95 % und innerhalb der ersten fünf Jahre hatten 74 % der Patienten keinen Rückfall erlitten. Anfang der 1990er wurde dann zusätzlich mit dem aus der klassischen chinesischen Medizin als Heilmittel bekannten Arsentrioxid (ATO) behandelt, das die Erfolge der ATRA-Behandlungen noch verbesserte (Wang and Chen, 2008).

ATRA und ATO führen zum Abbau oder zur Spaltung des PML-RAR α -Onkoproteins und in der Folge zur Aktivierung der durch das Fusionsprotein gehemmten Transkription. Dies resultiert somit in der terminalen Differenzierung der Promyelozyten. Mechanistisch erfolgt durch ATRA-Zugabe zum einen die Spaltung des Fusionsproteins durch Caspasen (Nervi et al., 1998). Zum anderen kann das PML-RAR α über den Ubiquitin/Proteasom-vermittelten Signalweg abgebaut werden. Die ATPase SUG-1 (*suppressor of Gal4*) bindet dabei an die Transaktivierungsdomäne von RAR α , wodurch eine Interaktion mit der regulatorischen 19S Proteasomuntereinheit des 26S Proteasoms zustande kommt (vom Baur et al., 1996; Zhu et al., 1999a).

ATO dagegen wirkt sich auf den PML-Teil des Fusionsproteins aus, wobei der molekulare Mechanismus bis zu Beginn dieser Arbeit nicht aufgeklärt war (Zhou et al., 2005). ATO verursacht eine SUMO-Modifikation von PML und den proteasomabhängigen Abbau (siehe Abb. 1.1.7). Notwendig für den ATO-induzierten proteasomalen Abbau von PML ist dabei die SUMOylierung an PML K160 (Lallemand-Breitenbach et al., 2001).

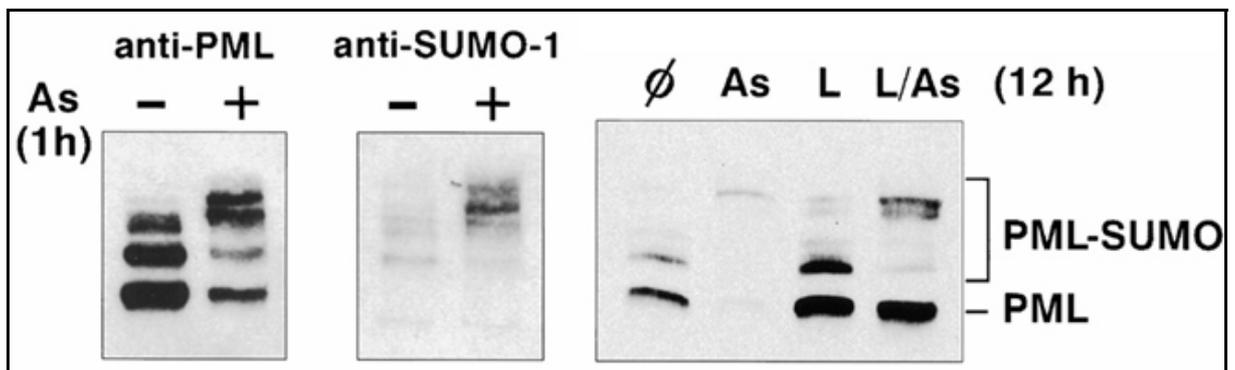


Abb. 1.1.7: ATO führt zum Abbau von PML: Analysiert wurden Lysate stabil mit PML transfizierter CHO-Zellen (aus Hamster). PML zeigt als Antwort auf ATO-Behandlung nach kurzer Zeit (1 h) einen Größenanstieg (linkes Feld, anti-PML Immunblot), der auf eine SUMO1-Modifikation zurückgeführt wird (mittleres Feld, anti-SUMO1 Immunblot). Nach längerer Inkubationszeit mit ATO (12 h) wird PML proteasomabhängig abgebaut, was durch den Proteasominhibitor Lactacystin (L) verhindert werden kann (rechtes Feld, anti-PML Immunblot). Ø: Kontrolle; As: ATO; aus (Lallemand-Breitenbach et al., 2001)

Allgemein führt die Behandlung von ATRA und ATO also zum Abbau des PML-RAR α Onkoproteins, wodurch der normale Retinol-Signalweg wieder hergestellt wird. RXR und PML bilden keine unnatürlichen Aggregate mehr und die PML-NBs können sich wieder ausbilden. Die Korepressoren werden freigesetzt und die Koaktivatoren werden wieder von RAR α rekrutiert und gebunden. Die Repression der Transkription von Zielgenen wird aufgehoben. ATRA induziert zusätzlich noch zyklisches AMP, das durch Aktivierung von Transkription die ATRA-vermittelte Differenzierung in den mutierten APL-Zellen verstärkt (Kamashev et al., 2004). Außerdem induziert ATRA die Expression von Retinsäure-induzierten Genen und von Cyclooxygenase 1, inhibiert die Angiogenese und stellt verschiedene Signaltransduktionswege wieder her (z.B. IFN Signalweg) (Liu et al., 2000; Rocca et al., 2004; Zhu et al., 1999b). Dadurch differenzieren sich die mutierten Promyelozyten und werden in der Folge durch Apoptose abgebaut (Zhou et al., 2005).

Wie genau ATO seine Wirkung in Tumorzellen entfaltet ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Wie bereits erwähnt (Abschnitt 1.1.1.) konnte nicht nur APL mit ATO behandelt werden. LICs (*leukaemia-initiating cells*), die sich im Ruhezustand befinden, können durch ATO aktiviert werden und so Ziel weiterer chemotherapeutischer

Behandlungen werden (Ito et al., 2008). ATO wirkt bei APL konzentrationsabhängig unterschiedlich. Niedrige Konzentrationen (0,1-0,5 μM) führen in APL-Zellen zur Zelldifferenzierung und hohe Konzentrationen zur Induktion von Apoptose (0,5 – 2 μM), was in *in vitro*- und *in vivo*-Studien nachgewiesen wurde (siehe Abb. 1.1.8) (Chen et al., 1997; Chen et al., 1996; Shao et al., 1998). Der Differenzierungseffekt von ATO ist dabei einzig bei APL nachzuweisen, da ATO direkt den Abbau des PML-RAR α -Fusionsproteins bewirkt (Chen et al., 1997). Die ATO-induzierte Apoptose dagegen kann auch in Zellen erfolgen, die kein PML-RAR α -Fusionsprotein beinhalten. ATO stimuliert auch in verschiedenen anderen malignen Zelllinien ohne PML-RAR α -Fusionsprotein (Neuroblastoma-, Multiple Myeloma- und andere hämatopoetische Zelllinien) den programmierten Zelltod (Akao et al., 2000; Bode and Dong, 2000; Grad et al., 2001). Die apoptotischen Effekte von PML wirken sich zumindest teilweise direkt auf die Mitochondrien aus. ATO-induzierte Apoptose ist mit einem Verlust des inneren mitochondrialen Transmembran-Potentials assoziiert, so dass Cytochrom C in das Zytosol freigesetzt wird (Cai et al., 2000; Chen et al., 1998). Der genaue Mechanismus, wie ATO die Apoptose induzieren kann muss aber noch entschlüsselt werden.

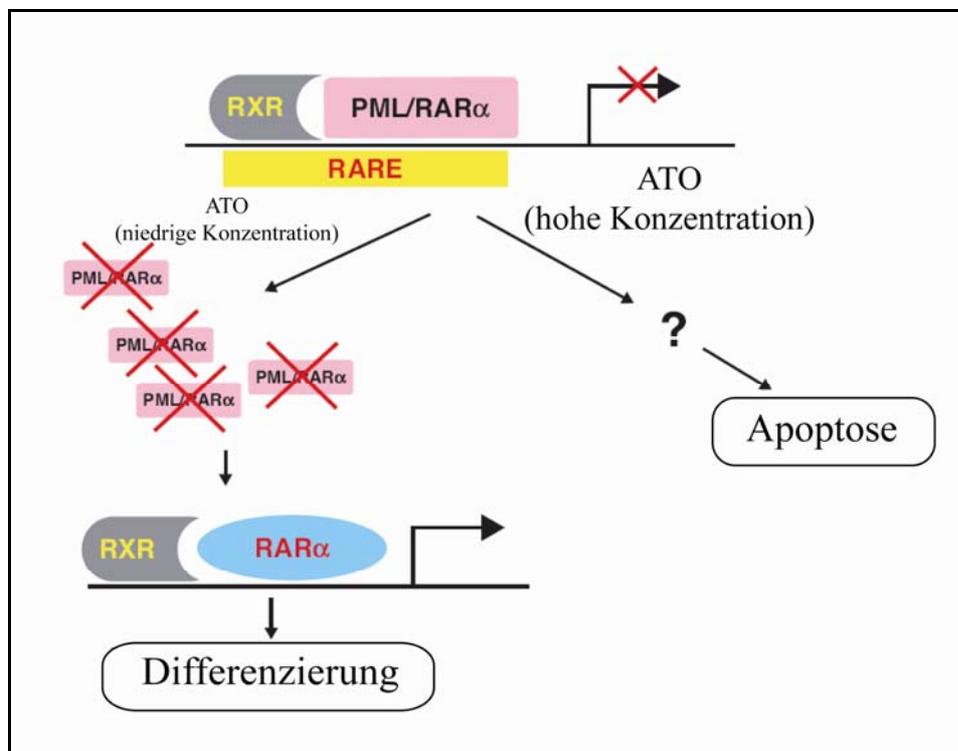


Abb. 1.1.7: Unterschiedliche Antwort von APL-Zellen auf ATO: ATO in niedrigen Konzentrationen induziert die Differenzierung von APL-Zellen durch den Abbau des PML-RAR α -Fusionsproteins. Hohe ATO-Konzentrationen induzieren Apoptose sowohl durch einen PML-RAR α -abhängigen wie auch unabhängigen Mechanismus. Verändert nach (Miller, 2002)

1.2 Posttranslationale Modifikation durch Ubiquitin und Ubiquitin-verwandte Proteine (UBL)

1.2.1 Ubiquitinierung

Eine Vielzahl von Mechanismen regulieren die *in vivo* Funktion von Proteinen. Ganz allgemein muss die Expression, die Umsatzrate, die Lokalisation, die Interaktion mit anderen Proteinen und eine enzymatische Aktivität gesteuert werden, wobei konstitutive oder reversible posttranslationale Modifikationen eine wichtige Rolle spielen. Diese im Allgemeinen enzymatisch vermittelten Modifikationen führen z.B. zur Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung, Carboxylierung, Adenylierung, Glycosylierung, Acylierung, Prenylierung oder der ADP-Ribosylierung von Aminosäureresten innerhalb der Proteine. Eine weitere posttranslationale Modifikation, die Ubiquitinierung, wurde Anfang der 1980er Jahre entdeckt (Hershko et al., 1983). Ubiquitin besteht nach der Prozessierung aus 76 Aminosäuren, hat eine molare Masse von 9 kDa und wird mittels einer Enzymkaskade (bestehend aus E1-, E2- und E3- Enzymen) über das C-terminale Glycin unter Ausbildung

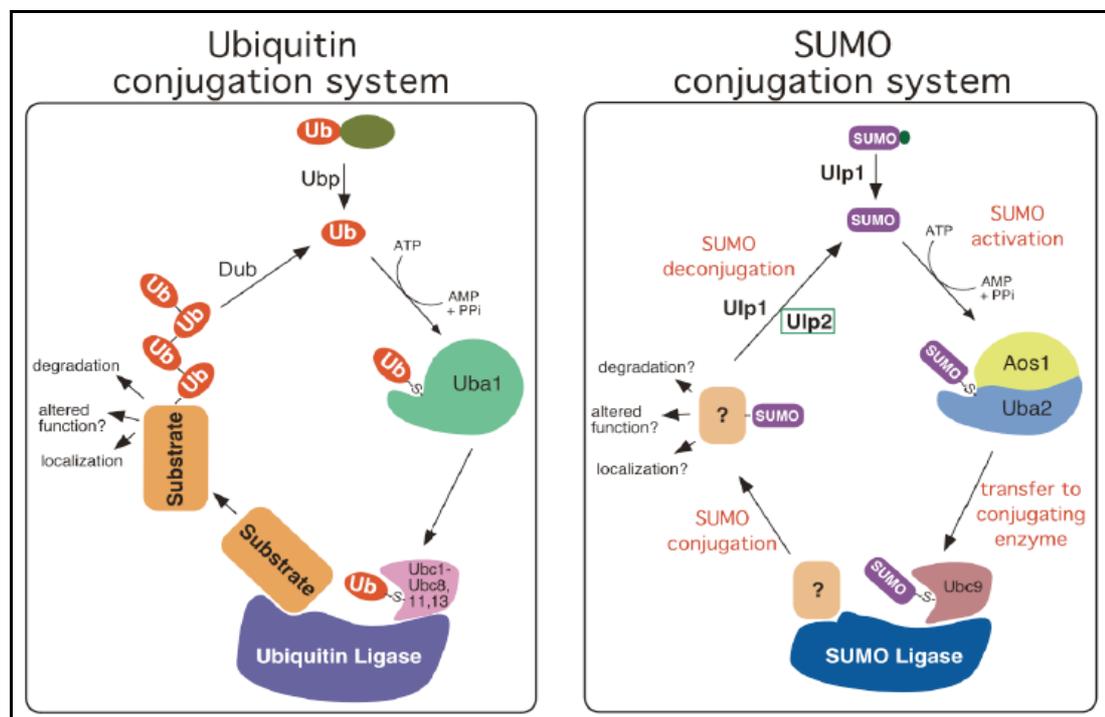


Abb. 1.2.1: Gegenüberstellung der Ubiquitin- und SUMO-konjugierenden Systeme in Hefe. Nachdem Ubiquitin oder SUMO durch Ubp (Ubiquitin spezifische Protease), bzw. Ulp1 (*Ubl (ubiquitin like) specific protease*) prozessiert wurde werden sie mittels einer Enzymkaskade über drei Schritte an einen Lysinrest des Zielproteins übertragen. Der erste Schritt wird unter ATP-Verbrauch von E1-Enzymen (Ubiquitin/SUMO aktivierendes Enzym) vermittelt, Uba2 bei Ubiquitin und das Heterodimer AOS1/UBA2 bei SUMO. Dabei bildet sich ein Thioester aus. Es folgt der Transfer vom E1 auf das E2, dem konjugierenden Enzym, ebenfalls über einen Thioester. Im Fall von Ubiquitin können das mehrere verschiedene E2-Enzyme sein (Ubc1-8,

11, 13), während bei der SUMOylierung nur Ubc9 als E2 aktiv ist. Mit Unterstützung einer E3-Ligasen wird dann das Ubiquitin oder SUMO auf das Zielprotein übertragen. Der Vorgang ist durch die Aktivität von spezifischen Proteasen reversibel (Dub (*deubiquitination enzyme*) oder Ulp). Durch Übertragung weiterer Ubiquitin oder SUMO-Moleküle auf die bereits angehängten können sich Ubiquitin- bzw. SUMO-Ketten an den Zielproteinen ausbilden (Dohmen, 2003a; Dohmen, 2003b).

einer Isopeptidbindung auf eine ϵ -Aminogruppe eines Lysins im Zielprotein übertragen (siehe Abb. 1.2.1). Diese kovalente Bindung kann durch spezifische Ubiquitin-Isopeptidasen wieder rückgängig gemacht werden. Die bekannteste Funktion der Ubiquitinierung ist der proteasomale Abbau von Zielproteinen über das 26S Proteasom, wobei die für den Abbau markierten Proteine eine polymere Ubiquitinkette tragen, die über das Lysin 48 der Ubiquitine verknüpft ist (Pickart, 2000). Obwohl die Anheftung von Ubiquitinketten in den meisten Fällen zum kompletten Abbau des Proteins führt, kann es in bestimmten Fällen auch zur Aktivierung der Proteine durch limitierte Proteolyse kommen (Melchior, 2000). Ubiquitinketten, die über das Lysin 63 verknüpft sind spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion (Windheim et al., 2007). Zusätzlich spielt die Monoubiquitinierung eine Rolle bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose (Hicke, 1997).

Eine hohe Spezifität der Ubiquitinierung wird durch die große Anzahl an E2- (Hefe 11, Mensch ca.100) und E3-Enzymen (Hefe 54, Mensch ca. 1000) ermöglicht. Die Ubiquitin-E3-Ligasen können in drei Klassen unterteilt werden. Die erste Klasse sind Proteine mit der F-*box* Domäne, die z.B. als Adapterproteine der modularen E3 Ubiquitin Ligase SCF (*Skp1-Cullin-F box*)-Komplexes zu finden sind. Dieser Komplex ist an der phosphorylierungsabhängigen Anheftung von Ubiquitin beteiligt, wodurch Zielproteine für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert werden (Craig and Tyers, 1999). Die zweite Klasse sind die Mitglieder der RING-Finger-Proteine. Sie binden über ein spezifisches Bindungsmotiv an ein Substrat und interagieren durch die RING-Domäne mit dem E2, das wiederum die Ubiquitinierung des Substrates katalysiert (Borden and Freemont, 1996). Die dritte Klasse umfasst E3-Enzyme mit der HECT-Domäne (*homologous to the E6-AP carboxyl terminus*), die im Gegensatz zu den anderen beiden Familien, eine transiente Thioesterbindung mit Ubiquitin eingehen und eine eigene katalytische Aktivität besitzen, um den Transfer von Ubiquitin zum Substrat zu ermöglichen (Hershko and Ciechanover, 1998).

1.2.2 Ubiquitin-verwandte Proteine (UBL)

Seit der Entdeckung von Ubiquitin, das von der Hefe bis zum Menschen in fast identischer Form vorkommt (nur drei Aminosäuren Unterschied), sind mehrere weitere verwandte Proteine (UBLs, *Ubiquitin-like proteins*) identifiziert worden, darunter ATG12p/ATG8p, NEDD8/Rub1, FAT10, ISG15, Urm1p, UFM1, Hub1 und die SUMO-Proteine. Alle diese Proteine werden über einen sehr ähnlichen Mechanismus wie bei der Ubiquitinierung über E1-, E2- und E3-Enzyme auf ihre Substrate übertragen.

ATG12p/ATG8p (*autophagy related 12/8 homolog*) ist an der Regulation der Autophagozytose beteiligt (Suzuki et al., 2004). Bei der Aktivierung von Ubiquitin-E3-Ligasen spielt das Protein NEDD8 (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8*) eine Rolle (Pan et al., 2004). ISG15 (*IFN stimulated gene 15*) reguliert Mechanismen in der Immunabwehr (Ritchie and Zhang, 2004) und FAT10 (*F-associated transcript 10*) ist für die Aufrechterhaltung des Spindelapparates während der Mitose verantwortlich (Liu et al., 1999) und hat, ähnlich wie ISG15, zwei Ubiquitin-ähnliche Domänen, weshalb FAT10 auch den Namen Diubiquitin trägt. Das Urm1 (*ubiquitin related modifier*) spielt eine Rolle bei der Antwort auf oxidativen Stress, für UFM1 (*ubiquitin-fold modifier 1*) ist keine Funktion bekannt und Hub1 (*homologous to ubiquitin 1*) ist beim Spleißen von pre-mRNA involviert (Kerscher et al., 2006).

1.2.3 SUMO

Die SUMO-Proteine werden auch über einen der Ubiquitinierung ähnlichen Mechanismus (siehe Abb. 1.2.1) kovalent an ihre Substrate gebunden. Dabei sind E3-Enzyme nicht zwingend erforderlich. In der Regel tragen die Zielproteine ein SUMOylierungsmotiv ((I/L/V)KxE). SUMO1 wurde 1996 als Modifikation des RanGAP1 (*Ran-GTPase-activating-protein 1*) entdeckt (Matunis et al., 1996). SUMO1 und Ubiquitin zeigen zwar nur eine relative geringe Sequenzhomologie (~18 %) sind aber in ihrer dreidimensionalen Struktur fast deckungsgleich (siehe Abb. 1.2.2) (Bayer et al., 1998; Dohmen, 2004).

Da SUMO1 zeitgleich von mehreren Gruppen entdeckt wurde findet man in der Literatur die alternativen Namen GMP1 (*GAP-modifying protein 1*) (Matunis et al., 1996), Ubl1 (*ubiquitin-like protein 1*) (Shen et al., 1996), PIC1 (*PML interacting protein 1*)

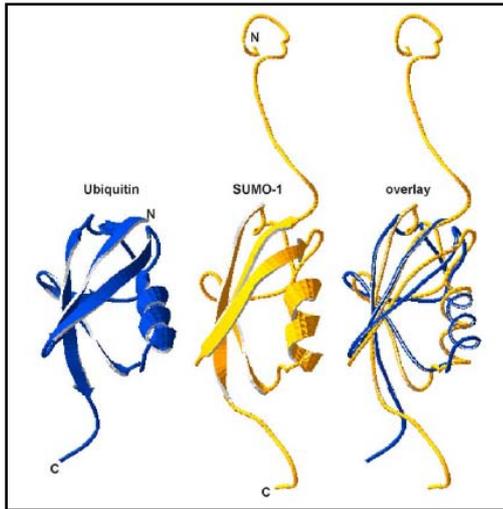


Abb. 1.2.2: Vergleich der 3D-Strukturen von Ubiquitin und SUMO1

Das humane SUMO1 zeigt, wie auch das Ubiquitin, das typische $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ Faltungsmotiv. Die beiden Strukturen unterscheiden sich durch die N-terminale flexible Verlängerung von SUMO1 (Dohmen, 2004).

(Boddy et al., 1996), Sentrin (Okura et al., 1996) und hSmt3 (*suppressor of Mif two 3*) (Mannen et al., 1996).

Zum Beginn dieser vorliegenden Arbeit gab es keinen Hinweis auf eine überlappende Funktion von SUMO++ und Ubiquitin. Im Zusammenhang mit dem Abbau von Proteinen wurde der SUMOylierung bisher nur die Rolle als Antagonist zugesprochen. Bei einem regulatorischen Protein des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*), dem I κ B α (*inhibitor of NF- κ B alpha*), konnte gezeigt werden, dass SUMO1 an den gleichen Lysinrest gebunden werden kann wie das

Ubiquitin. In der Folge wird diese kleine so modifizierte Fraktion von I κ B α nicht für den Abbau markiert wird (Desterro et al., 1998).

Das weitere Funktionsspektrum der SUMO-Modifikation reicht von der Regulation auf Transkriptionsebene über die Chromosomen-Segregation, die Kontrolle des Zellzyklus, über die DNA-Reparatur und -Replikation bis zur Regulation des aktiven Proteintransports zwischen Zytoplasma und Zellkern (Bachant et al., 2002; Hoege et al., 2002; Kawabe et al., 2000; Mahajan et al., 1997; Sobko et al., 2002; Verger et al., 2003). Diese Spannweite von verschiedenen Funktionen zeigt, dass die SUMO-Modifikation als Regulationsschalter für intrazelluläre Vorgänge dienen kann.

Mitglieder der SUMO-Proteinfamilie kommen in Protozoen, Metazoen, Pflanzen und Pilzen vor (Melchior, 2000). Im Menschen sind vier SUMO-Isoformen identifiziert worden (SUMO1-4). SUMO2 und SUMO3 unterscheiden sich in nur zwei Aminosäuren und werden daher häufig als SUMO2/3 zusammengefasst (Dohmen, 2004). SUMO2/3 besitzen zu SUMO1 eine 45 %ige Sequenzidentität und tragen in ihren N-terminalen Bereichen ein SUMOylierungsmotiv (siehe Abb. 1.2.3). Dieses Motiv findet sich auch in der einzigen SUMO-Isoform Smt3p in der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Die humane SUMO1 Isoform trägt kein SUMOylierungsmotiv, so dass SUMO2/3 und Smt3p *in vivo* polymere SUMO-Ketten ausbilden können, SUMO1 jedoch nicht (Tatham et al., 2001). SUMO4, das zwar auch ein SUMOylierungsmotiv trägt, scheint dagegen nur nicht-

kovalente Bindungen einzugehen, da ein Prolin-Rest die Prozessierung des Proteins verhindert (Owerbach et al., 2005).

Alle SUMO-Isoformen und viele andere Ubqs werden als Präproteine translatiert und müssen, bevor sie kovalent an ein Zielprotein gebunden werden können, durch spezifische Peptidasen prozessiert werden (siehe unten) (Dohmen, 2004).

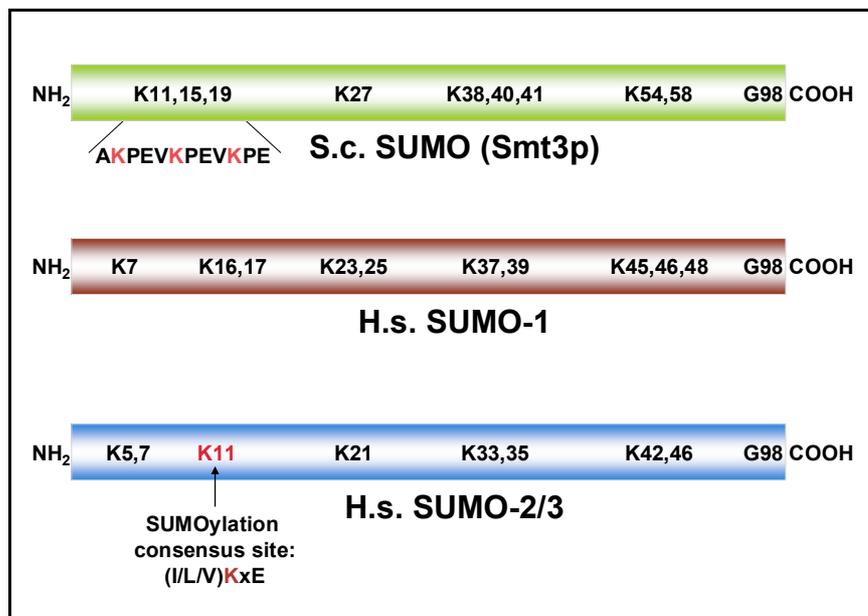


Abb. 1.2.3: Vergleich der SUMO-Isoformen der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) und des Menschen (*H. sapiens*): Die schematische Darstellung der verschiedenen SUMO-Isoformen aus Mensch und Hefe zeigt, dass Smt3p und SUMO2/3 ein SUMOylierungsmotiv (ψ KxE, wobei ψ eine aliphatische Aminosäure ist, z.B. L, I oder V) tragen, SUMO1 dagegen nicht (in rot die Lysine, an die SUMO geheftet werden kann). (Abbildung bereitgestellt von J. Dohmen und G. Praefcke)

Die Analyse von einer immer größer werdenden Anzahl von Proteinen, die SUMOyliert werden, führte zu einer Bestimmung eines SUMOylierungsmotivs: ψ KxE/D, wobei ψ eine aliphatische Aminosäure darstellt (Leucin, Isoleucin und Valin werden dabei favorisiert), auf das Akzeptor-Lysin folgt dann eine beliebige (x) und eine saure (Glutamat oder Aspartat) Aminosäure (Johnson, 2004). Dieses Konsensusmotiv ist ausreichend für eine SUMOylierung *in vitro*. Testproteine, auf die man das Motiv übertragen hatte, wurden *in vivo* SUMOyliert, wenn sie zusätzlich ein NLS tragen (Rodriguez et al., 2001). Das SUMOylierungsmotiv ermöglicht dabei die Interaktion mit dem E2-Konjugations-Enzym Ubc9, was erklärt, warum viele SUMOylierungen (z.B. von RanGAP1) auch ohne ein E3-Ligasen ablaufen können (Dohmen, 2004; Sampson et al., 2001). Es gibt aber auch SUMO-Zielproteine, die kein Konsensusmotiv tragen und deren Modifikation die Hilfe von E3-Ligasen benötigt. Ubc9 kann seine Spezifität für Zielproteine durch auto-SUMOylierung an Lysin 14 verändern. Eine neue Studie hat gezeigt, dass dadurch die

SUMOylierungsspezifität für z.B. PML, HDAC4, E2-25K oder TDG nicht verändert wird, aber RanGAP1 nicht mehr SUMOyliert wird. Stattdessen zeigt sich, dass Sp100 von modifiziertem Ubc9 viel stärker SUMOyliert wird (Knipscheer et al., 2008). Dabei bindet das SUMOylierte Ubc9 an Sp100 über dessen internes SIM. So wird die SUMOylierung auch ohne ein spezifisches E3 ermöglicht.

Im Gegensatz zum Ubiquitinierungsapparat der Zellen sind nur recht wenige unterschiedliche Enzyme bei der SUMOylierung involviert. Neben dem einzigen E1 (das Heterodimer AOS1/UBA2 (AOS1 (*activation of Sentrin/SUMO protein*), UBA2 (*putative ubiquitin-associated protein*)), und dem einzigen E2 (UBC9 (*ubiquitin conjugating enzyme*)) gibt es relativ wenige spezifische SUMO-E3-Ligasen. Zu diesen Ligasen gehören die Mitglieder der PIAS-Familie (*protein inhibitor of activated signal transducers*), das Nukleoporin RanBP2/Nup358 (*Ran binding protein 2/Nuclear pore complex protein Nup358*) und das Protein PC2 (*polycomb 2*). Im Unterschied zu den HECT-Ubiquitin-Ligasen gehen die SUMO-E3-Ligasen keine Thioester-Bindung mit dem SUMO ein. Stattdessen funktionieren sie als Hilfsproteine, die das SUMO-tragende Ubc9 und das Substrat in räumliche Nähe bringen, wobei angemerkt werden muss, dass der Mechanismus bei PC2 noch nicht aufgeklärt ist (Pichler et al., 2004).

PIAS1 gilt als prototypisches Mitglied der PIAS-Familie und wurde ursprünglich durch seine Eigenschaft charakterisiert den STAT (*signal transducers and activators of transcription*)-gesteuerten Signalweg zu inhibieren (Liu et al., 1998). Eine SUMO-E3-Funktion wurde für PIAS1 bei der SUMO1 Modifikation von p53 nachgewiesen (Kahyo et al., 2001). Zu etwa der gleichen Zeit konnte für die Hefe-Homologe von PIAS, Siz1 und Siz2, eine Rolle bei der SUMO-Modifizierung von Mitgliedern der Septin-Familie nachgewiesen werden (Johnson and Gupta, 2001). Proteine der PIAS-Familie haben eine typische Domänenstruktur, bestehend aus einer N-terminalen SAP (SAF-A/B, Acinus, PIAS)-Domäne, einer zentral gelegenen RING-Finger Domäne, in der zwei Cysteine der typischen RING-Finger durch ein Serin und ein Aspartat ausgetauscht sind, und einer C-terminalen alkalischen Domäne. In einer Veröffentlichung von 2005 (Rosas-Acosta et al., 2005) wurde eine Liste der bis dahin bekannten Substrate für die SUMO-E3-Ligasen-Aktivität von PIAS Proteinen aufgestellt: p53, GRIP1, AR, LEF1, c-Jun, c-Myb, Mdm2, IRF-1, C/EBP α , Sp3, PLAG1, PPAR, Smad4, Smad3, MR, STAT1, Axin und die Septin Familie in der Hefe.

RanBP2 ist die größte strukturelle Komponente des Kernporen-Komplexes und ist an den zytosolischen Fibrillen der Kernpore lokalisiert (Wu et al., 1995). RanBP2 besitzt zwei

Zink-Finger, vier RanGTP-Bindedomänen, mehrerer FG-Wiederholungen (*FG repeats*) und eine Domäne mit zwei internen *Repeat*-Motiven. Letztere ermöglicht RanBP2 die Interaktion mit Ubc9 und kann selbst auch mit SUMO1 modifiziert werden (Matunis et al., 1998). Eine verkürzte Version der Domäne mit den internen *Repeat*-Motiven wird zum einen stärker SUMOyliert, stimuliert aber zum anderen auch die SUMOylierung von Sp100, HDAC4 und Mdm2 (Kirsh et al., 2002; Miyauchi et al., 2002; Pichler et al., 2002). Die dritte bekannte SUMO-E3-Ligasen, PC2, ist strukturell weder mit den beiden zuvor besprochenen SUMO-E3 Gruppen noch mit einer bekannten Ubiquitin-Ligase verwandt. Die Mitglieder der *Polycomb*-Gruppe (PcG) bilden einen multimeren, mikroskopisch sichtbaren Komplex innerhalb des Zellkerns, die so genannten PcG-Körper (Spector, 2001). PcG-Proteine modifizieren Histone, was in der Folge zur transkriptionellen Stilllegung von bestimmten Genen führt. PC2 kann sowohl den transkriptionellen Ko-Repressor CtBP (*C-terminal binding protein*) als auch Ubc9 zu den PcG-Körpern rekrutiert und stimuliert auch die SUMOylierung von CtBP *in vitro* und *in vivo* (Dohmen, 2004; Lin et al., 2003).

Endogenes SUMO1 ist in unbehandelten Zellen zumeist an seinen Zielproteinen konjugiert vorzufinden, dagegen liegen SUMO2/3 hauptsächlich als freie Formen vor. Bei zellulärem Stress allerdings wird SUMO2/3 dann aber schnell an Zielproteine gekoppelt, was einen Hinweis auf unterschiedliche Funktionen der Isoformen SUMO1 und SUMO2/3 geben kann (Saitoh and Hinchey, 2000). Unterschiedliche Verteilungen der Isoformen wurde auch im Zellkern festgestellt, wobei SUMO2/3 gleichmäßig im Nukleosol verteilt ist und das SUMO1 sich auf den Nukleolus, die PML-NBs und die Kernhülle konzentriert (Ayaydin and Dasso, 2004).

Die SUMO-Modifizierung ermöglicht im Allgemeinen dem Zielprotein neue Protein-Protein-Interaktion einzugehen. Mit großer Wahrscheinlichkeit spielt dabei das schon zuvor erwähnte SIM, das auch als SBM (SUMO-Bindungsmotiv) bezeichnet wird, eine entscheidende Rolle (Hannich et al., 2005; Lin et al., 2006; Shen et al., 2006). Proteine, die ein SIM tragen, können sehr gut mit SUMOylierten Proteinen interagieren. Es können zwei verschiedenen Arten von SIMs unterschieden werden. Zuerst entdeckt wurde das SIMa (Song et al., 2004), das aus drei hydrophoben (I, L oder V) und 3-4 sauren Resten (D und E) aufgebaut ist (Uzunova et al., 2007). Die hydrophoben Reste können auf mehrere Arten arrangiert sein (V/I-V/I-X-V/I/L oder V/I-X-V/I-V/I). Diese Reste formen einen β -Strang, interagieren mit dem zweiten β -Strang eines SUMOs und bilden gemeinsam entweder eine parallele oder antiparallele β -Faltblatt-Struktur aus (Song et al., 2005). Außerhalb des

eigentlichen SIMs gelegene Aminosäurereste können die spezifische Bindung zu den SUMO-Isoformen durch elektrostatische Wechselwirkungen beeinflussen (Hecker et al., 2006). Das SIMa kann auch in inverser Form, zuerst die sauren, dann die hydrophoben Reste, vorliegen, wie am Beispiel RanBP2 zu erkennen ist (Uzunova et al., 2007). Das zweite SIM, das SIMb, wird dagegen aus der kurzen Konsensussequenz I/V D L T/D zusammengesetzt und kommt zum Beispiel in der SUMO-E3-Ligase PIAS vor (Uzunova et al., 2007).

Die Familie der SENPs (*sentrin/SUMO-specific protease*) spielt eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Status von SUMO-modifizierten Proteinen innerhalb der Zelle. Zum einen besitzen die SENPs die Fähigkeit SUMO zur reifen Form zu prozessieren. Dabei wird, wie in Abbildung 1.2.1 erwähnt, über eine Hydrolaseaktivität der C-Terminus von preSUMO (*precursor SUMO*) prozessiert, so dass endständig zwei Glycine exponiert werden. Die Konjugation des SUMOs an das Akzeptorlysine des Substrats erfolgt wie bei allen UBLs dann über das c-terminale Glycin in Form einer Peptidbindung. Die SUMO-spezifische Isopeptidase-Aktivität der SENPs wird benötigt, um einzelne SUMO-Moleküle vom Substrat wieder abzuspalten oder aber SUMO-Ketten am Substrat zu depolymerisieren (Hay, 2007). In der Bäckerhefe *S.cerevisiae* übernehmen die SENPs Ulp1 und Ulp2 die Dekonjugation von Smt3 von den modifizierten Proteinen oder die Prozessierung der Smt3-Vorstufe (Li and Hochstrasser, 1999, 2000; Schwienhorst et al., 2000). Aus dem Sequenzvergleich von Ulp1 und Ulp2 kann eine gemeinsame Protease-Domäne identifiziert werden, die sich über ca. 200 aa erstreckt. Im Menschen finden sich sieben homologe Proteine. Dabei sind SENP1, 2, 3 und 5 näher mit Ulp1, und SENP6 und 7 näher mit Ulp2 verwandt (Hay, 2007). Das siebte Homolog SENP8 scheint keine SUMO- sondern eine Nedd8-spezifische Protease zu sein (Gan-Erdene et al., 2003). Ulp1 und Ulp2 sind nicht redundant sondern zeigen unterschiedliche Phänotypen wenn diese Gene mutiert werden. Als Beispiel akkumulieren in Hefen mit einer Ulp2-Deletion hochmolekulare Smt3-Protein-Konjugate, was in Ulp1-defizienten Stämmen nicht der Fall ist (Bylebyl et al., 2003). Daher gilt Ulp2 als die Protease, die spezifisch an der Dekonjugation von SUMO-Ketten beteiligt ist. Auch die humanen SENPs haben unterschiedliche Funktionen. In Zellen, die z.B. SENP1 defizient sind, akkumulieren sowohl unprozessiertes preSUMO1 als auch SUMO1-Konjugate. Die Prozessierung und Dekonjugation von SUMO2 zeigt sich dagegen unverändert (Yamaguchi et al., 2005). SENP1 lokalisiert im Nukleus und akkumuliert in subnukleären Domänen (Bachant et al., 2002). SENP2, das am nächsten mit SENP1 verwandt ist, lokalisiert primär an die

Filamente des nukleären Poren-Komplexes (Zhang et al., 2002), akkumuliert aber auch in subnukleären Domänen (Ross et al., 2002). SENP3 und SENP5 lokalisieren beide im Nukleolus und zeigen eine Präferenz SUMO2/3 zu prozessieren und zu dekonjugieren (Gong and Yeh, 2006; Nishida et al., 2000). Die Funktion und Lokalisation des Ulp2-verwandten SENP7 ist bisher wenig charakterisiert. Das sehr nah verwandte SENP6 zeigt, ähnlich wie Ulp2, eine Präferenz polymere SUMO2/3-Ketten zu schneiden und lokalisiert im Nukleoplasma. Zudem wird SENP6 eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der PML-NBs zugesprochen (Hay, 2007; Mukhopadhyay et al., 2006).

1.3 Ziel dieser Arbeit

Eine Aufgabe dieser Arbeit war die Untersuchung der Modifikation und der Interaktion des PML-Proteins. Für diese Studien sollte ein *in vitro* und *in vivo* SUMOylierungssystem etabliert werden, mit dessen Hilfe SUMO-modifiziertes PML dargestellt werden könnte, um es im Anschluss biochemisch untersuchen zu können.

Die zweite Aufgabe bestand in der Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen dem SUMO- und dem Ubiquitin-Signalweg. Zu Beginn dieser Arbeit war eine direkte Verbindung zwischen dem SUMO- und dem Ubiquitinsystem ungeklärt. Kristina Uzunova aus dem Labor von Dr. Jürgen Dohmen konnte in der Hefe *S.cerevisiae* eine Ubiquitin-abhängige proteolytische Kontrolle von SUMO-Konjugaten nachweisen. Auf dieser Grundlage war es Ziel der vorliegenden Arbeit nachzuweisen, dass dieser Mechanismus von der Hefe zum Menschen konserviert vorzufinden ist.

Da es in höheren Vertebraten nicht nur eine sondern vier SUMO-Isoformen gibt, sollte ergründet werden, ob sich die Isoformen in diesem Zusammenhang unterschiedlich verhalten.

Insbesondere sollte ein spezifisches Substrat identifiziert werden, an dem sich der Mechanismus des SUMO-abhängigen Abbaus über das 26S Proteasom nachvollziehen lässt. Als Kandidat kam das PML-Protein in Frage. Generell sollten die posttranskriptionelle Modifikationen von PML mit SUMO auf biochemische Weise untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungen

Für alle experimentellen Ansätze wurden die Lösungen mit Reinstwasser (Milli-Q Synthesis, Millipore, Schwalbach) angesetzt. Bei Bedarf wurden die Lösungen entweder steril filtriert (0,2 µm Filter, Sartorius, Göttingen) oder autoklaviert (20 min; 121 °C).

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck Bioscience (Darmstadt), Pierce (Rockford, USA), Qiagen (Hilden), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe) und Jena Bioscience (Jena) bezogen und entsprachen sämtlich der Qualitätseinstufung p.a. (*pro analysis*). Oligonukleotide, die für Sequenzierung (Kartuschen gereinigt), Klonierung oder Mutagenese (HPLC gereinigt) verwendet wurden, wurden von der Firma Biomers (Ulm) bezogen.

Für die Kultivierung von Bakterien wurde Luria-Bertani (LB)-Medium verwendet. Medienbestandteile bzw. -Zusätze für Bakterien wurden von Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

PVDF-Membran 0,45 µm	Millipore, Schwalbach
<i>Blotting</i> Papier (Whatman)	Macherey-Nagel, Düren
Parafilm M, Laboratory Film	Roth, Karlsruhe
Röntgenfilme; Super RX	Fujifilm, Düsseldorf
Reaktionsgefäße: (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 15 ml bzw. 50 ml Röhren)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten (6 Well)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen (100 x 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger (76 x 26 mm)	Roth, Karlsruhe
Deckgläser (22 x 22 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Sterile Pipetten Zellkultur	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.2 Reagenzienbaukästen (Kits)

BigDye v 3.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Nucleo Spin Extraction Kit	Macherey-Nagel, Düren
Plasmid Midikit	Qiagen, Hilden
SUMOylierungs Kit	Biomol GmbH, Hamburg

2.1.3 Säulenmaterialien

HiLoad Superdex 200	GE Healthcare Biosciences, Freiburg
GSH-Sepharose FF	GE Healthcare Biosciences, Freiburg
Glutathion 4B Sepharose	GE Healthcare Biosciences, Freiburg
Ni-NTA-Agarose Superflow	Qiagen, Hilden

2.1.4 Chemikalien

Interferon- γ ; human, rekombinant	Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA
Arsentrioxid (ATO)	Alfa Aesar, Karlsruhe
MG132	Biomol GmbH, Hamburg
<i>Prolong Gold antifade reagent</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-FLAG M2 Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
NiNTA Agarose	Qiagen, Hilden
0,25 % Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Substrate	Roche, Mannheim
<i>Gene Juice Transfection Reagent</i>	Novagen, Schwalbach
<u>Größenmarker</u>	
1 kb DNA-Leiter (39314.01)	Serva, Darmstadt
100 bp Leiter äquimolar (39311.01)	Serva, Darmstadt
<i>Prestained SDS-PAGE-Marker</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Unstained SDS-PAGE-Marker</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<u>Proteaseinhibitoren</u>	
Protease Inhibitor Mix, EDTA frei	Roche, Mannheim

PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Roth, Karlsruhe
Leupeptin Hemisulfat	Roth, Karlsruhe
Pepstatin A	Serva, Darmstadt

2.1.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Jena Bioscience, Jena, oder New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Benzonase	Novagen, Schwalbach
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a.M
KOD-DNA-Polymerase	Merck Bioscience, Darmstadt
T4 DNA-Ligase	Jena Bioscience, Jena
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Frankfurt a.M
Taq-DNA-Polymerase	Eigene Herstellung
<i>Pfu</i> Turbo-DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam NL
Benzonase	Novagen, Schwalbach
Creatin Kinase / Phosphatase	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.6 Plasmide

Plasmid	Resistenz	Herkunft
pGEX-2Tk-SUMO1	AMP	Prof. M. Scheffner
pGEX-4T2-SUMO2	AMP	Prof. M. Scheffner
pET-11a-hRanGAP1	AMP	Dr. I. Schwienhorst
pET-11a-hSUMO1	AMP	Prof. F. Melchior
pET-11d-hUBA2	AMP	Prof. F. Melchior
pET-23a-mUbc9	AMP	Prof. F. Melchior
pET-28a-hAOS1	KAN	Prof. F. Melchior
pOTB7-PML 11	CAM	RZPD-Klon (Bc_020994)
pCMV-Tag2-b-FLAG Leervektor	KAN	Novagen
pCMV-Tag2-b-Flag PML 11 (1-503)	KAN	eigene Herstellung
pCMV-Tag2-b-Flag PML 11 (1-522)	KAN	eigene Herstellung
pCMV-Tag2-b-Flag PML 11 (1-522) K160R	KAN	eigene Herstellung

pCMV-Tag2-b-Flag PML11 FL 1-781	KAN	eigene Herstellung
pCMV-Tag2-b-Flag PML6 FL 1-633	KAN	eigene Herstellung
pCMV-TAG3-b-Myc Leervektor	KAN	Novagen
pCMV-Tag3-b-myc SUMO 1	KAN	eigene Herstellung
pCMV-Tag3-b-myc SUMO 2	KAN	eigene Herstellung
pCMV-Tag3-b-myc SUMO 2K11R	KAN	eigene Herstellung
pCMV-Tag3-b-myc SUMO 3	KAN	eigene Herstellung
pCMV-Tag3-b-myc SUMO 3K11R	KAN	eigene Herstellung
pGEX-TN-hPML11 Ring+B1(49-179)	AMP	eigene Herstellung
pGEX-TN-hPML11 (aa1-522)	AMP	eigene Herstellung
pGEX-TN-hPML11 (aa1-522) K160R	AMP	eigene Herstellung
pGEX-TN-hPML11 (aa1-503)	AMP	eigene Herstellung
pET-DUET-PML RING B1 (aa 49-179)	AMP	eigene Herstellung
pCDF-hAOS1-UBA2	STR	eigene Herstellung
pRSF-mUbc9-SUMO1	KAN	eigene Herstellung
pCDNA3-HA-Ubiquitin	AMP	Prof. Y. Yarden

Tab. 2.1.1: Plasmide und Vektoren: AMP: Ampicillin; KAN: Kanamycin; STR: Streptomycin; CAM: Chloramphenicol

2.1.7 Bakterienstämme

Zellstamm

Escherichia coli (*E. coli*) DH5 α

Genotyp

$\Phi 80dlacZM\Delta M15$, *recA1*, *endA1*,
gyrA96, *thi-1*, *hsdR17*(r_K^- , m_K^+), *supE44*,
relA1, *deoR*, $\Delta(lacZYA-argF)U169$
(Woodcock et al., 1989)

Escherichia coli Rosetta 2 (DE3)

F^+ *ompT* *hsdS_B*(r_B^- , m_B^-) *gal dcm*
(DE3) (Novagen, Schwalbach)

Escherichia coli Rosetta 2 (DE3) pLysS

F^+ *ompT* *hsdS_B*(r_B^- , m_B^-) *gal dcm*
(DE3) pLysSpRARE (Cam^R)
(Novagen, Schwalbach)

Escherichia coli BL21(DE3)

B, F^- , *dcm*, *ompT*, *hsdS* (r_B^- m_B^-),
gal (DE3) (Weiner and Vaillancourt,
1994)

2.1.8 Antikörper

Primäre Antikörper:

Anti-c-Myc (M 4439)	Sigma-Aldrich, Steinheim, monoklonales Antiserum (Klon 9E10) aus Maus
Anti-c-Myc (Klon 9E10)	Abcam, Cambridge, GB, polyklonales Antiserum aus Kaninchen
Anti-FLAG (M2, F3165)	Sigma-Aldrich, Steinheim, monoklonales Antiserum aus Maus
Anti-FLAG (F7425)	Sigma-Aldrich, Steinheim, polyklonales Antiserum Nr. (F7425) aus Kaninchen
Anti-GST (Z-5): sc-459	Santa Cruz Biotechnology, INC., Heidelberg, polyklonales Antiserum aus Kaninchen
Anti-PML (sc5621)	Santa Cruz Biotechnology, INC., Heidelberg polyklonales Antiserum aus Kaninchen
Anti-PML (A20, sc-9863)	Santa Cruz Biotechnology, INC., Heidelberg polyklonales Antiserum aus Ziege
Anti-PML (PG-M3): sc-966	Santa Cruz Biotechnology, INC., Heidelberg monoklonales Antiserum aus Maus
Anti-PML (5E10)	Antiserum aus Maus, von Prof. Roel van Driel und Ineke van der Kraan (Amsterdam, NL)
Anti-RGS-His ₄	Qiagen, Hilden, monoklonales Antiserum aus Maus
Anti-SUMO1 (33-2400)	Zymed Laboratories, San Francisco, USA, monoklonales Antiserum (Klon 21C7) aus Maus
Anti-SUMO2 (ab22654)	Abcam, Cambridge, GB, polyklonales Antiserum aus Kaninchen
Anti-Tubulin (T6199)	Sigma-Aldrich, Steinheim, monoklonales Antiserum (Klon DM1A) aus Maus
Anti-Ubiquitin (sc-8017)	Santa Cruz Biotechnology, INC., Heidelberg, monoklonales Antiserum (Klon P4D1) aus Maus

Sekundäre Antikörper für Western Blot-Analyse:

Ziege-anti-Maus IgG-HRP (*horseradish peroxidase*)-konjugiert, Bio-Rad (München)
Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP (*horseradishperoxidase*)-konjugiert, Bio-Rad
(München)

2.1.9 Puffer und Medien

Hier werden einige allgemeine Puffer aufgelistet. Für speziellere Anwendungen werden die Puffer separat in den jeweiligen Unterkapiteln aufgeführt

Urea-Puffer:

2 x SDS-PP, 7% β -MeOH, 8M Urea

RIPA-Puffer:

50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % Protease Inhibitor Mix, 20 mM NEM

RIPA-Waschpuffer:

RIPA-Puffer mit 0,1 % SDS

PBS-Puffer:

136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄

PBS/T-Puffer:

136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, 0,1 % Tween 20

LB (*Luria-Bertani*) - Medium für Bakterien

1 % Baktotrypton, 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl (LB-Agar-Platten: 2 % Agar zugesetzt.)

Alle Flüssigmedien wurden autoklaviert (20 min; 121 °C) und bei RT gelagert. Medien mit Agar wurden autoklaviert und in sterile Petrischalen gegossen (25-30 ml/Schale). Zur Selektion auf plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem LB-Medium Ampicillin (Endkonzentration 100 μ g/ml), Chloramphenicol (Endkonzentration 34 μ g/ml) oder Kanamycin (Endkonzentration 30 μ g/ml) zugesetzt. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Klonierungen zur Erlangung der Plasmidkonstrukte wurden mit dem *E.coli* Bakterienstamm DH5 α durchgeführt. Die Bakterien wurden in einem geeigneten Volumen an LB-Medium auf dem Schüttler bei 150-250 rpm oder auf LB-Agarplatten in einem Brutschrank bei 37 °C über Nacht (ÜN) kultiviert.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA in kleineren oder auch größeren Mengen (Mini-Präparation, bzw. Midi-Präparation) basiert auf dem Prinzip des Aufschlusses der Bakterien durch alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) mit anschließender Fällung durch Isopropanol oder Reinigung mit Ionentauschern. Größere Mengen wurden mit einem Plasmid-Midi oder Maxi Kit nach Angaben des Hersteller isoliert. Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm Wellenlänge.

Resuspendierungs-Puffer (P1): 6,06 g Tris und 3,72 g Na₂EDTA werden in 800 ml H₂O aufgelöst, der pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt, das Volumen auf 1 l mit H₂O aufgefüllt; vor dem ersten Gebrauch wird 100 mg/l RNase A zugegeben

Lyse-Puffer (P2): 8 g NaOH wird in 950 ml H₂O aufgelöst, Zugabe von 50 ml und 20% SDS (w/v)

Neutralisierungs-Puffer (P3): 294,5 g Kaliumacetat wird in 500 ml H₂O aufgelöst, der pH-Wert wird mit Eisessigsäure auf 5,5 eingestellt (~110 ml), das Volumen auf 1 l mit H₂O aufgefüllt

endotoxinfreier TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

2.2.3 Endonukleolytische Spaltung von DNA

Die Endonukleolytische Spaltung von Plasmid-DNA wurde zu analytischen und präparativen Zwecken eingesetzt.

Für einen analytischen Einsatz wurden 100-500 ng DNA, für den präparativen 1 - 4 µg DNA verwendet. Je µg DNA wurden 1 – 10 Unit (U) des ausgewählten Enzyms eingesetzt. Eine Unit entspricht der Menge eines Restriktionsenzym, die benötigt wird um 1 µg λ-Phagen-DNA in einem Volumen von 50 µl innerhalb 1 h bei bestimmter Inkubations-Temperatur zu schneiden.

2.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen (0,75 -2 % Agarose in TAE mit 30 µg/100 ml EtOBr) durch Anlegen eines elektrischen Feldes.

Die angelegte Spannung während des Gellaufs betrug zwischen 40 V und 80 V bei einer Laufzeit zwischen 30 min und 2 h.

Zum Beladen eines Gels musste zu der DNA-Probe in einem Verhältnis von 10 zu 1 Blaumarker gegeben werden. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde ein DNA-Größenmarker aufgetragen (1 kb Leiter oder 100 bp Leiter,).

TAE-Puffer:

40 mM Tris-Acetat

1 mM EDTA

10 x Blaumarker:

90% Glycerin

10 mM Tris-Cl, pH 8,0

50 mM EDTA

0,01% Bromphenol

0,01% Xylen-Cyanol

2.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden aus einem Agarosegel unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung erfolgte mit Gel-Extraction Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers.

2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA Fragmenten in einen Vektor erfolgte bei 20 °C für 1 h:

linearisierter, dephosphorylierter Vektor	20 – 30 ng DNA
Insert	3 – 10 x molarer Überschuss
T4-DNA-Ligase	1 µl (400 U)
10x T4-DNA-Ligase Puffer	10% des Ansatzes
H ₂ O	auf 20 µl Endvolumen auffüllen

Ligationsansatz für das Religieren eines Vektors:

linearisierter Vektor	5-20 ng DNA
T4-DNA-Ligase	1 µl (400 U)
10x T4-DNA-Ligase Puffer	10% des Ansatzes
H ₂ O	auf 20 µl Endvolumen auffüllen

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Standard-PCR dient zur *in vitro* Amplifizierung linearisierter DNA (Mullis *et al.*, 1986) für Subklonierungen, wobei sowohl neue Restriktionsstellen eingeführt als auch verkürzte Genfragmente erzeugt werden konnten.

Der 50 µl Standard-Ansatz beinhaltet:

5 µl	10 x KOD HiFi DNA Polymerase-Puffer
0,2 mM	dNTPs

1 mM	MgCl ₂
0,4 µM	3'- und 5'-Primer
2,5 U/µl	KOD HiFi DNA Polymerase (Novagen, Schwalbach)
0,05 - 0,1 mg	Matritze in Wasser gelöst

Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 15 s bei 98 °C denaturiert und dann 25 - 30 Zyklen folgenden Bedingungen ausgesetzt:

Denaturierung: 98 °C, 15 - 30 s

Hybridisierung: 50 - 68 °C, 1 - 30 s

Der Primer mit der niedrigeren Schmelztemperatur (T_m) bestimmte die Hybridisierungstemperatur, die nicht über der Schmelztemperatur des Primers liegen durfte. Die Schmelztemperaturen von Oligonukleotiden wurden mit Hilfe des Programms pDraw bestimmt (<http://www.acaclone.com/>).

Elongation: 72 °C, 20 - 60 s

2.2.8 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen wurden Bakterien vom DH5 α -Stamm nach dem Protokoll von Hannahan behandelt (Hannahan and Meselson, 1983). Hierfür wurden 4 ml LB⁺⁺ Medium (LB-Medium in dem zusätzlich 20 mM MgSO₄ und 10 mM KCl gelöst sind) mit einer DH5 α -Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln wachsen lassen.

Als nächstes wurde dann 1 ml der Übernachtskultur zu 100 ml LB⁺⁺ gegeben und weiter bei 37 °C inkubiert bis zu einer optischen Dichte von 0,4 bis 0,55 bei 600 nm. Anschließend wurde die Kultur auf Eis abgekühlt, auf zwei 50 ml fassende Reaktionsgefäße verteilt und für 10 min und 2800 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen jeweils in 15 ml kaltem TFB I resuspendiert. Die beiden Zellsuspensionen wurden dann wieder vereinigt und für 10 min bei 4 °C belassen. Nach abermaliger Zentrifugation (2800 g, 4 °C, 10 min) und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 4 ml TFB II resuspendiert und auf bei -20 °C vorgekühlte 1,5 ml

Reaktionsgefäße verteilt (100 µl/Reaktionsgefäß). Die Aliquots wurden dann sofort auf –80 °C eingefroren.

Die Transformationseffizienz der kompetenten Zellen wurden durch die Transformation von 1 ng DNA in 100 µl kompetente DH5α Zellen getestet. Die errechnete Transformationsrate sollte bei gut einsetzbaren kompetenten Zellen anschließend bei 10^3 – 10^4 gewachsener Kolonien pro Platte liegen.

TFB I:

30 mM Kaliumacetat

50 mM MnCl₂

100 mM RbCl

10 mM CaCl₂

15% (w/v) Glycerin

pH 5,8

TFB II:

10 mM NaMOPS, pH 7,0

75 mM CaCl₂

10 mM RbCl

15% (w/v) Glycerin

2.2.9 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid DNA

Für die Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA wurden 100 µl kompetente Zellen (siehe 2.2.8) auf Eis aufgetaut, 60-1000 ng DNA zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Nach 45 s Hitzeschock in einen auf 42 °C vorgeheizten Heizblock wurden 400 µl LB-Medium zu den Zellen gegeben und diese dann für 1 h in einem Heizblock unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. 50 – 500 µl wurden anschließend auf LB-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen. Die Zellen, die Plasmid-DNA mit einem Antibiotikumresistenzgen aufgenommen haben, bildeten dann bei 37 °C über Nacht Kolonien auf den LB-Platten aus.

2.2.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) mittels eines *ABI Prism[®] BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Reaction Kits* (Applied Biosystems) nach Angabe des Herstellers. Ein Ansatz für eine Sequenzreaktion bestand aus 200 bis 500 ng der zu sequenzierenden DNA sowie 0,5 µl des Big Dye Mix

3.1, 10 pmol Primer, 1,5 µl V-Puffer und wurde auf ein Endvolumen von 10 µl mit H₂O aufgefüllt.

Nach erfolgter Sequenzierungsreaktion in einem Thermocycler (25x (30 sec 96 °C; 15 sec 50 °C; 4 min 60 °C); dann auf 4 °C) wurde der Ansatz nochmals mit 10 µl Wasser aufgefüllt und an das Sequenzierungslabor gegeben. Die anschließende computergestützte Analyse der DNA Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Programme „Vector NTI Suite 5.5“ (Informax) und „BioEdit Sequence Alignment Editor“ (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in einem denaturierenden und diskontinuierlichen Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970). Je nach Größe der zu trennenden Proteine wurden Trenngel mit einem Polyacrylamidgehalt von 8 – 12 % verwendet, die mit einem Sammelgel (4 % Polyacrylamid) überschichtet wurden. Die aufzutrennende Proteinlösung wurde vor dem Gelauftrag mit 1/5 Volumen 5 x Probenpuffer versetzt und 2 - 5 min bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer bei 28 mA/Gel oder bei großen Gelen (15 cm x 15 cm) mit konstanter Spannung von 60 V über Nacht. Als Protein-Marker wurde *Unstained SDS-PAGE Standards* oder *Prestained SDS-PAGE Standards* von Fermentas verwendet.

	4 % Sammelgel	10 % Trenngel
30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	500 µl	2,5 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	-	2,6 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1,3 ml	-
H ₂ O	3,1 ml	4,8 ml
10 % SDS	50 µl	100 µl
APS	50 µl	100 µl
TEMED	5 µl	10 µl
Gesamt	5 ml	10ml

Tab. 2.3.1: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

10 x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris Base
1 % (w/v) SDS
2,5 M Glycin

5 x SDS-Probenpuffer:

10 % (w/v) SDS
200 mM Tris/HCl pH 6,8
50 % (v/v) Glycerin
7 % (v/v) β -Mercaptoethanol
0,05 % (w/v) Bromphenolblau

2.3.2 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie

Proteine wurden mit dem Farbstoff „Coomassie Brilliant Blue R 250“ (Serva) angefärbt. Die Gele wurden für ca. 30 min in „Coomassie“-Färbelösung gelegt. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, muss der nicht am Protein gebundene Farbstoff aus dem Gel gelöst werden. Hierfür wurden die Gele in eine Entfärbelösung gelegt.

Färbelösung:

0,125 % (w/v) R 250 (Serva)
20 % (v/v) Ethanol
10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

20 % (v/v) Ethanol
10 % (v/v) Essigsäure

2.3.3 Transfer und Immobilisierung von Proteinen (*Western-Blot-Analyse*)

Nach der Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE (siehe 2.3.2) wurden die Proteine aus dem Gel auf eine immobilisierende PVDF-Membran (Polyvinylidenfluoridmembran von Millipore; Schwalbach) transferiert (Towbin et al., 1979).

Der Transfer erfolgte bei konstantem Strom von 4 mA / cm² *Blot*-Fläche über 30 min bei kleinen Gelen (7 cm x 6 cm). Bei großen Gelen (15 cm x 15 cm) wurden die Proteine aus dem Trenngel und dem Sammelgel über 2-3 h bei 240 mA transferiert.

Nach dem Elektrotransfer wurden die Banden des Protein-Markers (*Prestained SDS-PAGE Standards*, Fermentas) auf der Membran sichtbar. Diese Färbung diente als Kontrolle für den Transfer.

Transferpuffer:

10% (v/v) Methanol

1,5% (v/v) Glycin

25 mM Tris

2.3.4 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Der immunologische Nachweis immobilisierter Proteine erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die unspezifischen Bindestellen auf der PVDF-Membran mit 5 % Magermilchpulver in PBS/T blockiert (1 h, RT). Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert (1 h, RT) und dann dreimal über 7 min mit 1 x PBS/T gewaschen. Der spezifische Antigen-Antikörperkomplex konnte mit dem Sekundärantikörper nachgewiesen werden (1 h, RT), an den Meerrettichperoxidase (HRP *horseradish peroxidase*) gekoppelt war. Danach wurde die Membran wieder dreimal über 7 min mit 1 x PBS/T und zuletzt für 15 min in PBS gewaschen. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten auf einem Kippschüttler.

Die spezifischen Antigen / Primärantikörper / Sekundärantikörper-Komplexe wurden mit dem *Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate* der Firma Roche nach Herstellerangaben detektiert.

2.3.5 Reinigung von Proteinen

2.3.5.1 Expression von Proteinen und Aufschluss der Bakterien

Eine einzelne Kolonie eines zuvor für Expression geeigneten mit dem gewünschten Expressionsvektor transformierten Bakterienstamms (siehe 2.1.7) wird in je eine 10 ml Vorkultur (LB + Selektionsmarker) gegeben und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen. Am nächsten Morgen werden die Vorkulturen auf vorgewärmte 5 l Kolben mit 2 l LB/Selektionsmarker gegeben und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Expression des gewünschten Proteins wurde bei einer OD_{600} von 0,6 - 0,8 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) induziert. Bei Zinkfinger Proteinen (z.B. PML) wurde zusätzlich noch ZnCl₂ (20 µM Endkonzentration) dem Medium zugegeben. Die Expression erfolgte, je nach Protein, bei 30 oder 37 °C für 3-6 h oder bei 18 °C über Nacht. Die Zellen

wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet (JLA 8100 Rotor, 4 °C bei 6000 - 7000 g), in ca. 25 ml GST Puffer I pro Pellet resuspendiert, abermals zentrifugiert (4 °C, 5500 x g, 20 min), gewogen und pro Gramm mit 2 ml des Puffers resuspendiert, der für die nachfolgende Reinigung benötigt wurde. Schließlich wurden die resuspendierten Zellen eingefroren (-80 °C). Die tiefgefrorenen Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit einem Zelldisruptor (Emulsiflex, Avestin) Apparatur aufgeschlossen (3 Durchläufe). Bei manchen schwerer löslichen Proteinen (PML) wurde nun zusätzlich Sarkosyl (2 % Endkonzentration) zugegeben. Daraufhin wurde das Lysat bei 30.000 g für 60 - 90 min 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde zur Reinigung weiterverwendet.

2.3.5.2 Glutathion-Affinitätschromatographie

Die Reinigung von GST-Fusionsproteinen erfolgte mit der Glutathion-Affinitätschromatographie.

Die Matrix (GSH-Sepharose FF) wurde mit GST-Puffer I äquilibriert und anschließend mit dem Überstand der Lysatzentrifugation beladen und solange mit GST-Puffer I gewaschen bis die Absorption wieder den Nullwert erreichte. Dann wurde mit 2-3 Säulenvolumina GST-Puffer II und anschließend mit 2 Säulenvolumina GST-Puffer I gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 ml GST-Elutionspuffer in 8 ml Fraktionen.

GST-Puffer I: 50 mM Tris/HCl (pH 7,5)
 150 mM NaCl
 2 mM DTT

GST-Puffer II: 50 mM Tris/HCl (pH 7,5)
 300 mM NaCl
 2 mM DTT

GST-Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
 100 mM NaCl
 2 mM DTT
 10 mM Glutathion

Alternativ konnte das Protein auch mit Hilfe einer Protease (in unserem Fall TEV(= *tobacco etch virus*)-Protease, eigene Herstellung), von seinem Fusionsteil abgeschnitten

werden. Dazu wurde ein Säulenvolumen GST-Puffer I mit 50 mM TEV-Protease gefüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde mit GST-Puffer I gewaschen und somit das vom GST abgetrennte Protein eluiert.

2.3.5.3 Ionenaustauschchromatographie

Die Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie erfolgte über die Q-Sepharose FF. Die Säule wurde mit Q-Sepharose-Puffer 1 äquilibriert und die aufzutrennende Proteinlösung auf die Säule geladen. Anschließend wurde mit 2 - 3 Säulenvolumina Q-Sepharose-Puffer 1 gewaschen. Zur Elution wurde die Salzkonzentration durch graduelle Zugabe über etwa 7 Säulenvolumina des Q-Sepharose-Puffers 2 auf 1 M NaCl erhöht. Bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min wurden Fraktionen von je 4 ml aufgenommen.

Q-Sepharose-Puffer 1:

50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

2 mM DTT

Q-Sepharose-Puffer 2:

50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

1 M NaCl

2 mM DTT

2.3.5.4 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie oder Gelfiltration trennt Moleküle nach ihrer Größe (Molekulargewicht und Form). Die Säule (Superdex 200 26/60) wurde mit GST-Puffer 1 äquilibriert. Die Probe wurde in einem Volumen von maximal 1 % des Säulenvolumens aufgetragen (siehe 2.3.5.5). Bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1-2 ml/min werden die Proteine ihrer Größe nach getrennt und in Fraktionsgrößen von 4 ml gesammelt.

2.3.5.5 Proteinkonzentrierung durch Ultrafiltration

Die Konzentrierung von Proteinen erfolgte durch Ultrafiltration mit Amicon Ultra-15 *Centrifugal Filter Units* mit Porengrößen von 10 bzw. 30 kDa nach Angaben des Herstellers (Millipore, Schwalbach).

2.3.5.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976) durch Mischen von 1 bis 10 µl der zu bestimmenden Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz (Perbio, Bonn) und Messung der Absorption bei 595 nm gegen reines Bradford-Reagenz. Die Proteinkonzentration in der Probe wurde mithilfe einer zuvor erstellten BSA-Kalibriergeraden mit bekannten Proteinkonzentrationen ermittelt.

2.3.5.7 Expression und Reinigung von His-Aos1/Uba2 (SUMO E1)

Als Grundlage für die Kapitel 1.3.5.7 und 8 dienten Protokolle aus dem Labor von Frauke Melchior, in denen das *in vitro* SUMOylierungssystem etabliert wurde.

Tag 1:

In ein 100 µl Aliquot kompetenter *Rosetta BL21 DE3* wurden die Plasmide pET28a-Aos1 und pET11d-Uba2 gemeinsam transformiert (siehe 2.2.9). Anstelle die Bakterien auszuplattieren wurden sie direkt in 500 ml LB/Amp/Kan gegeben und 18 h bei 37 °C im Schüttler (150 rpm) inkubiert.

Tag 2:

Nach einer 6 stündigen Inkubation bei 25 °C/ 150 rpm und zuvoriger Zugabe von 1,5 l LB/Amp/Kan und IPTG Endkonzentration von 1 mM, wurden die Bakterien pelletiert (20 min, 4000 g, 4 °C). Das Pellet wurde in 50 ml Lysispuffer resuspendiert (50 mM Naphosphat pH8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) und anschließend bei -80 °C weggefroren. Das Einfrieren ist für die Lyse notwendig.

Tag 3:

Das aufgetaute Pellet wurde unter Zugabe von Proteaseinhibitoren (0,1 mM PMSF, je 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin), sowie 1 mM β-Mercaptoethanol und Lysozym (1 mg/ml Endkonzentration) für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C für 1h bei 4000 g zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand auf eine mit Lysispuffer äquilibrierte NiNTA Säule (5 ml Volumen) aufgetragen und mit 8 Säulenvolumina Waschpuffer (= Lysispuffer aber mit 20 mM Imidazol) gewaschen. Mit 3 Säulenvolumina Elutionspuffer (=Lysispuffer aber mit 250 mM Imidazol) wurden dann die Proteine in 2 ml Fraktionen eluiert.

10 µl der Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und die die E1 Enzyme tragenden Fraktionen anschließend zusammengefasst und auf eine zuvor mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte Superdex 200 Säule aufgetragen.

Lysispuffer	Stock Lösung
50 mM Na-Phosphat pH 8,0	1 M
300 mM NaCl	5 M
10 mM Imidazol	Feststoff
0,1 mM PMSF	0,1 M in EtOH
1 mM β-Mercaptoethanol	14,335 M
1 µg/ml Aprotinin	10 mg/ml in H ₂ O
1 µg/ml Leupeptin	10 mg/ml in H ₂ O
1 µg/ml Pepstatin	10 mg/ml in DMSO

Gelfiltrationspuffer	Stock Lösung
50 mM Tris pH 7,5	1 M
50 mM NaCl	5 M
1 M DTT	0,5 M
1 µg/ml Aprotinin	10 mg/ml in H ₂ O
1 µg/ml Leupeptin	10 mg/ml in H ₂ O
1 µg/ml Pepstatin	10 mg/ml in DMSO

Tag 4:

Nachdem nun 5 ml Fraktionen gesammelt wurden und die einzelnen Protein tragenden Fraktionen mit Hilfe eines weiteren Coomassie Gels identifiziert wurden, wurden die Fraktionen in denen sowohl Aos1 (~40 kD) als auch Uba2 (~90 kDa) vorhanden waren vereinigt und abschließend über eine MonoQ Säule (1 ml Säulenvolumen) gegeben. Diese wurde zuvor mit dem Gelfiltrationspuffer äquilibriert. Die Elution (0,5 ml / Fraktion) erfolgt über einen 50 mM bis 500 mM steigenden Salzgradienten im Gelfiltrationspuffer. Von diesen Elutionsfraktionen wurden abermals 2,5 µl auf ein Coomassiegel (8 %) aufgetragen und die Fraktionen, die äquimolare Mengen an Aos1 und Uba2 beinhalteten, wurden vereinigt und über Nacht mit Dialyseschläuchen (Pierce) gegen den Transportpuffer (TB) dialysiert (Nach (Pichler et al., 2002)).

Transportpuffer (TB)	Stock Lösung
20 mM HEPES pH 7,3	1 M
110 mM Kalium-Acetat	1 M
0,5 mM EGTA	0,5 M
1 Mm DTT	0,5 M
1 µg/ml Aprotinin	10 mg/ml in H ₂ O
1 µg/ml Leupeptin	10 mg/ml in H ₂ O
1 µg/ml Pepstatin	10 mg/ml in DMSO

Tag 5:

Die E1 Enzyme wurden nun in kleinen Mengen (10 µl) aliquotiert und mit Hilfe flüssigem Stickstoffs schockgefroren. Aos1/Uba2 verlieren durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren ihre enzymatische Aktivität, daher sollte jedes Aliquot nur einmal benutzt werden. Eine hohe Verdünnung der E1 Enzyme kann mit Hilfe von 0,05 % Tween und 0,2 mg/ml Ovalbumin stabilisiert werden.

2.3.5.8 Expression und Reinigung von Ubc9 (SUMO E2)

Tag 1:

Das Plasmid pET23a-Ubc9 wurde in kompetente BL21 (DE3) Zellen transformiert und auf LB/Amp Platten ausgestrichen (siehe 2.2.9).

Tag 2:

Eine 20 ml Kultur LB/Amp wurde mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tag 3:

Das Pellet der über Nacht Kultur wurde in frische 2 l LB/Amp gegeben und auf eine OD_{600} von 0,5-0,6 hochgezogen um sie dann mit 1 mM IPTG für 3-4 h bei 37 °C exprimieren zu lassen. Das geerntete Pellet wird in 60 ml Phosphatpuffer (50 mM Na-Phosphat pH 6,5 und 50 mM NaCl) und bei -80 °C tiefgefroren (siehe Tag 4).

Tag 4:

Die Bakterien wurden aufgetaut und nur Proteaseinhibitoren (PMSF, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin) und DTT (1 mM Endkonzentration) zugegeben. Durch das Einfrieren und anschließende Auftauen sind die Bakterien für das relativ kleine Ubc9 (20 kDa) durchlässig geworden und mussten nicht komplett aufgebrochen werden. Anschließend wurde bei 4 °C für 1h bei 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine zuvor mit 100 ml Phosphatpuffer und dann mit 50 ml Phosphatpuffer plus Proteaseinhibitoren und DTT (siehe oben) gewaschene SP-Sepharose Säule aufgetragen. Eluiert wurde das Protein über einen Salzgradienten, der von 50 mM bis auf 300 mM ansteigt.

Die laut FPLC Schreiber Protein enthaltenen 2 ml Fraktionen wurden auf ein Coomassie Gel (12%) aufgetragen und jene Fraktionen, die das Ubc9 beinhalten wurden vereinigt und mit Hilfe von Ultrafiltration mit Amicon Ultra-15 *Centrifugal Filter Units* mit einer Porengröße von 5 kDa nach Angaben des Herstellers (Millipore, Schwalbach) auf 2 ml konzentriert. Eine Superdex 200 Säule wurde mit Transportpuffer (siehe Abschnitt 2.3.5.7) äquilibriert, das Konzentrat wird dann auf diese Säule gegeben. Die gesammelten 5 ml Fraktionen, die Ubc9 enthielten wurden in 10 µl Aliquots verteilt, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.6 *In vitro* SUMOylierung

Für die *in vitro* SUMOylierungsreaktion wurden zunächst alle für die posttranslationale Modifikation benötigten Proteine gereinigt und in ihrer Konzentration bestimmt. Dann wurden die Proteine in geeignetem Verhältnis mit dem Reaktionspuffer (Transportpuffer, siehe Abschnitt 2.3.5.7) verdünnt und in bestimmten Molaritäten in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt und Anwesenheit eines ATP regenerierendem Systems bei 37 °C für einen jeweils angegebenen Zeitraum (Standard 30 min) inkubiert.

Tabelle 2.3.2 zeigt die Zusammenstellung der Komponenten für ein typisches Experiment.

Protein	Endkonzentration (μM)
SUMO1 oder SUMO2	1 μM
E1 (AOS1/UBA2)	70 nM
E2 (mUbc9)	10 nM
Substrat	800 nM
Creatine Phosphatase	10 mM
Creatine Kinase	10 U/ml
ATP	1 mM

Tab. 2.3.2: Angaben zu den Molaritäten der eingesetzten Proteine für einen 20 μl Ansatz einer *in vitro* SUMOylierung

2.3.7 SUMOylierung mit einem trimeren Vektorsystem

Die Etablierung eines bakteriellen *in vivo* Expressionssystems für die SUMOylierung und anschließende Reinigung von GST-markiertem Substrat benötigte die gleichzeitige Expression von mindestens fünf verschiedenen Proteinen. Damit man SUMO, E1 (AOS1/UBA2), E2 (mUbc9) und das Substrat parallel in Bakterien exprimieren konnte, wurde das Duet Vektorsystem von Novagen verwendet. Drei Vektoren mit jeweils zwei offenen Leserastern (*Open Reading Frames*, ORFs) besitzen verschiedene Replikationsursprünge (*Origins of replication*, ORI) sowie verschiedene Antibiotikaresistenzen.

Für die bakterielle Expression von SUMOyliertem Substrat wurden kompetente BL21 Stämme hergestellt, die jeweils zwei Duet-Vektoren mit den Komponenten E1, E2 und SUMO exprimieren können. Diese kompetenten Zellen wurden dann mit einem dritten Vektor transformiert auf dem das Substrat, GST markiert, und ein etwaiges E3 Enzym kloniert wurden. Abbildung 2.3.1 zeigt das trimere Vektorsystem, mit dessen Hilfe die gleichzeitige Expression von bis zu sechs verschiedenen Proteinen ermöglicht wird. Eine anschließende Reinigung des Substrates mit der Glutathion –Affinitätschromatographie (siehe 2..3.5.2) war somit durchführbar.

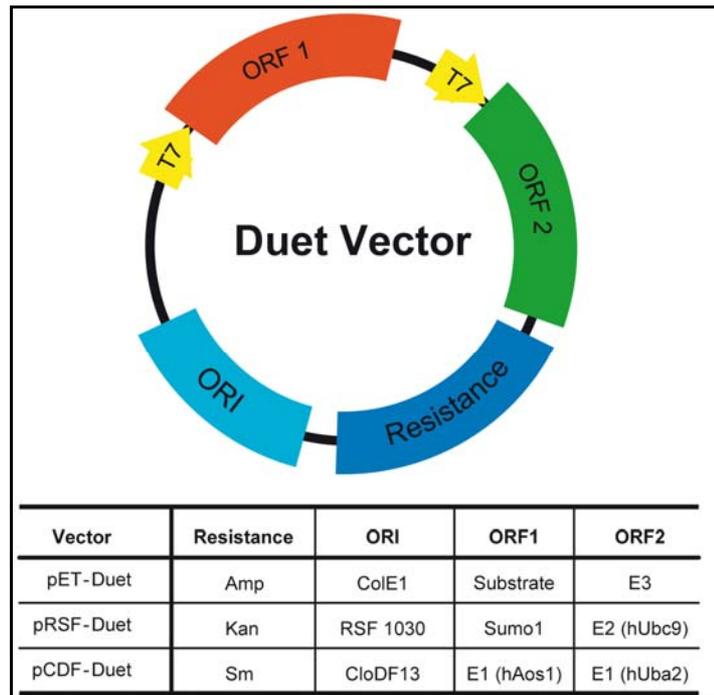


Abbildung 2.3.1: Das trimere Duet Vektor System.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkultur

Die für die Zellkulturarbeiten verwendeten Plastikmaterialien wurden von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht) und Greiner (Solingen) bezogen (Kapitel 2.1.1). Die Experimente mit lebenden Säugerzellen wurden an einer Sterilbank (LaminAir MA 2M 48 GS; Heraeus (Hanau)) durchgeführt.

2.4.2 Verwendete Zelllinien

HeLa B, Tumorzellen, (ECACC No 85060701) der *European Collection of Cell Culture* (Sigma-Aldrich, Steinheim)

T-REx™ HeLa-Zellen, Tetracyclin reguliertes Expressionssystem für Säugerzellen, von Invitrogen (Paisley, UK) stabile Zelllinien für Leervektor, His-SUMO1, His-SUMO2, His-SUMO3, hergestellt von Anke Krause (geborene Meinecke) (Meinecke, 2008).

2.4.3 Kultivierung humaner Zellen

Die HeLa B-Zellen wurden in folgendem Medium aufgezogen:

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*); (Gibco/ Invitrogen, Paisley, UK)

+ 10 % FCS (*foetal calf serum*); (Sigma-Aldrich, Steinheim)

+ 1 % non-essential amino acids (NAA); (Sigma-Aldrich, Steinheim)

+ 1 % Penicillin / Streptomycin; (Sigma-Aldrich, Steinheim)

+ 200 μ M L-Glutamin; (Gibco/ Invitrogen, Paisley, UK)

Die T-RExTM Zellen wurden in EMEM (*Eagle's Minimal essentiell Medium*) (Gibco/ Invitrogen, Paisley, UK) mit folgenden Zusätzen aufgezogen:

+ 10 % FCS (*foetal calf serum*); (Sigma-Aldrich, Steinheim)

+ 1 % non-essential amino acids (NAA); (Sigma-Aldrich, Steinheim)

+ 1 % Penicillin / Streptomycin; (Sigma-Aldrich, Steinheim)

+ 0,15 % ZeocinTM; (Invivo Gen, Toulouse, Frankreich)

+ 0,05 % Blastocidin; (Invivo Gen, Toulouse, Frankreich)

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgt bei 37 °C, 5 % Kohlendioxid und bei 100 % Luftfeuchtigkeit in dem Inkubator C200 der Firma BeLoTec (Göttingen). Um immunologische Reaktionen der Zellen auf das im FCS befindliche Komplementsystem zu verhindern wurde dieses durch eine 30-minütige Inkubation bei 56 °C inaktiviert. Die Antibiotika Penicillin und Streptomycin schützen die Zellen vor bakterieller Kontamination. Zur Selektion der stabil transfizierten T-RExTM Zellen wird dem Medium Blastocidin und ZeocinTM beigefügt.

2.4.4 Vermehrung humaner Zellen

Da es sich bei allen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien um adhärent wachsende Zellen handelt, mussten für die Expansion die Zellen vom Plastikuntergrund gelöst werden. Dabei müssen 80-90 % konfluent bewachsene Schalen (10 cm) wieder auf neue Schalen aufgeteilt werden. Zuerst wird das Medium abgenommen und die Zellen dann mit 10 ml 1x PBS gewaschen, damit schließlich die Zellen mit 1 ml Trypsin (Inkubation 1-2 min) gelöst werden können. Die Zellen wurden mit einer Pipette von den Schalen abgenommen

und in ein zuvor mit 1,5 ml Medium befüllten 15 ml Reaktionsgefäß gegeben, um anschließend sedimentiert (300 x g, 5 Minuten, 4 °C) zu werden. In die neuen Schalen wurden je 10 ml Medium vorgelegt und das resuspendierte Pellet gleichmäßig verteilt. HeLa B Zellen wurden 1:10 und T-RExTM Zellen 1:4 aufgeteilt.

2.4.5 Transfektion kultivierter Zellen

Die Transfektion der Zellen mit Plasmiden, erfolgte mit *Gene Juice Transfection Reagent* der Firma Novagen (Schwalbach) nach Angaben des Herstellers.

2.4.6 Stimulation/ Induktion

Je nach Experiment wurden die Zellen mit verschiedenen Reagenzien stimuliert, bzw. induziert. Bei Experimenten mit Interferon- γ (IFN- γ) wurden die Zellen mit 200 U/ml über einen Zeitraum von 24 oder 48 Stunden behandelt. Mit 1 μ M Arsentrioxid (ATO) wurden die Zellen je 6 Stunden und mit 2 μ M MG132 für je 3 Stunden stimuliert.

Die SUMO-Expression in den T-RexTM HeLa-Zellen wurde ca. 22 Stunden vor der Ernte durch Ablösen des Tet-Repressors mit 1 μ g/ml Doxycyclin T-RExTM Zellen induziert.

Die Zugabe von Interferon- γ , ATO und Doxycyclin erfolgte zusammen mit einem Mediumwechsel, MG132 wurde mit Medium auf ein Volumen von 100 μ l aufgefüllt und dann gleichmäßig auf das Medium der Zellen getropft.

2.4.7 Zellaufschluss

HeLa B- oder T-RexTM Zellen wurden in kaltem PBS von den Platten (6 well, 10 cm oder 15 cm) gekratzt, nachdem zuvor das Medium abgenommen und einmal mit PBS gewaschen wurde. Die Zellen wurden nach Zentrifugation (5 min, 1200 g, 4 °C) vom Überstand befreit und eingefroren (-80 °C) und diente so als Ausgangsmaterial einmal für den TCA- und zum anderen für den Urea-Aufschluss.

Zellaufschluss mit 2 x SDS-Probenpuffer/Urea

Bei den Hs27 und HeLa B-Zellen im 6 well/ 10 cm Platte wurde zum gleichen Zeitpunkt das Medium abgenommen und sie wurden mit 5/ 10 ml 1 x PBS gewaschen. Die Zelllyse

erfolgte in 200 µl/ 500 µl Urea-Puffer, dem zuvor Benzonase (1:10.000) zugefügt wurde. Die von den Platten abgenommenen Proben wurden 5 min bei 95 °C aufgeköcht und konnten dann analysiert werden (Boutell and Everett, 2003).

Zellaufschluss mit Trichloressigsäure (TCA) oder Ureapuffer

TCA-Aufschluss (je nach Ausgangsmaterial wurden unterschiedliche Volumina an Lösungen zugegeben, siehe Tabelle 2.3.3): Zuerst wird das Pellet in Lysepuffer vollständig resuspendiert (1,85 N NaOH + 7,4 % β-Mercaptoethanol) und 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Proteine mit 50 % TCA gefällt, während sie nach kurzem Vortexen 15 min auf Eis inkubieren. Schließlich wurden die Proben zentrifugiert (20.000 x g, 10 min, 4 °C), das gefällte Protein mit eiskaltem Aceton gewaschen, wieder sedimentiert (20.000 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Protein wurde in TSG/DTT (Dithiothreitol) (TSG/DTT = 0,5 M Tris, 6,5 % SDS, 12 % Glycerol; + 100 mM DTT) ca. 1 Stunde auf einem Vibraxrüttler bei Raumtemperatur gelöst.

Ausgangsmaterial	6 well	10 cm Platte	15 cm Platte
Lysepuffer	100 µl	250 µl	450 µl
50% TCA	150 µl	300 µl	500 µl
Aceton	300 µl	500 µl	600 µl
TSG/DTT	100-200 µl	200-300 µl	200-400 µl

Tab. 2.3.3: Auflistung der zugegebenen Lösungen für TCA-Aufschluss

Urea-Aufschluss: Für die Lyse der Zellen wurde 550 µl Urea-Lysispuffer (8 M Urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1% Triton, 0,1% SDS, 1 mM β-ME und Benzonase) auf das Pellet gegeben, gevortext, 10 min bei RT inkubiert und schließlich für 2 min auf 95 °C erhitzt. Der Überstand nach Zentrifugation (15 min mit 16.200 rcf bei 18 °C) konnte für einen NiNTA-Pull Down verwendet werden.

2.4.8 Affinitätsreinigung mit FLAG

Nach TCA Aufschluss der behandelten T-RExTM Zellen konnten FLAG-konjugierte Proteine isoliert werden. Dafür wurden 300 µl des Aufschlusses mit 14 ml RIPA-Puffer versetzt, sedimentiert (5467 x g, 7 Minuten, 4 °C) und in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß

überführt. An je 50 µl anti-FLAG Matrix konnten die Proteine über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopffroller binden. Am nächsten Morgen wurde die FLAG-Matrix ohne Zentrifugation bei 4 °C sedimentiert und mit 1 ml Wasch-Puffer (RIPA mit 0,1% SDS) in ein 1,5 ml Teströhrchen überführt. Es folgten drei Waschungen mit je 1 ml Waschpuffer, wobei auch hier die Matrix bei 4 °C für 5-10 min sedimentiert wurde. Die Elution erfolgte bei 37 °C mit 80 µl 2 x Laemmli Laufpuffer ohne DTT über einen Zeitraum von 20 Minuten. Mit Kapillarspitzen wurden die ca. 80 µl Probe in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zusammen mit 6 µl 2 M DTT 5 Minuten bei 95 °C gekocht und auf ein Gel aufgetragen.

Für eine anschließende Ni-NTA Isolierung wurde mit Hilfe des Urea Puffers eluiert.

2.4.9 Affinitätsreinigung mit Ni-NTA

Für die Ni-NTA Reinigung diente als Ausgangsmaterial entweder der unter dem Punkt Zellaufschluss aufgeführte Urea-Aufschluss oder das mit Ureapuffer eluierte Eluat der FLAG Reinigung. Dies wurde zu 50 µl Ni-NTA Superflow in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit Urea Puffer I auf 1300 µl aufgefüllt und bei 4 °C für 1 h mit Hilfe eines Rollators inkubiert.

Nachdem sich die Matrix nach circa 10 min bei RT gesetzt hatte („1 x g Zentrifugation“), konnte der Überstand verworfen werden und das Sediment 4 x mit Urea Puffer II gewaschen werden. Dabei wurden die Proben 2 min gerollt und sich anschließend 5-10 min die Matrix absetzen lassen. Anschließend wurde sie mit 100 µl Urea Elutionspuffer bei RT und zwischenzeitlichem anschnippen ca. 15 min bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (1 min RT bei 16.200 ref) wurde der Elutionsüberstand ÜS (~150 µl) mit Kapillarspitzen abgenommen und mit 20 µl 5x SDS PP versehen. Nach 5 min bei 95 °C, wurden 90 µl davon auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Wurde eine FLAG Reinigung im Anschluss durchgeführt wurde das Eluat analog des TCA Aufschlusses eingesetzt, d.h. circa 150 µl wurde zu 12 ml RIPA Puffer zusammen mit der anti-FLAG Matrix gegeben. Die Urea-Puffer sind in der Tabelle 2.3.4 aufgeführt.

	Urea-Puffer I (Tris pH 8.0)	Urea-Puffer II (Tris pH 6.3)	Elution Urea-Puffer
Urea	8 M	8 M	8 M
NaH ₂ PO ₄	100 mM	100 mM	100 mM
Tris/HCl (Stock 1M)	pH 8.0 10 mM	pH 6.3 10 mM	pH 4,7
Imidazol	-	-	1 M

Tab. 2.3.4: Auflistung der verschiedenen Urea-Puffer

3 Ergebnisse

3.1 *in vitro* SUMOylierung

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, ein *in vitro* SUMOylierungssystem zu etablieren, um größere Mengen SUMOylierter Protein darstellen zu können. Als Substrate sollten verkürzte Versionen des PML11 Proteins getestet werden.

3.1.1 Reinigung der einzelnen Komponenten

Die Reinigung der einzelnen Komponenten erfolgte über mehrere Schritte und wird im Material und Methoden Teil dieser Arbeit ausführlich beschrieben (Abschnitt 2.3.5). Die Substrate wurden über eine N-terminale GST-Markierung gereinigt, die nicht abgespalten wurde, um gegebenenfalls mit einem GST-Antikörper den Erfolg der SUMOylierung überprüfen zu können.

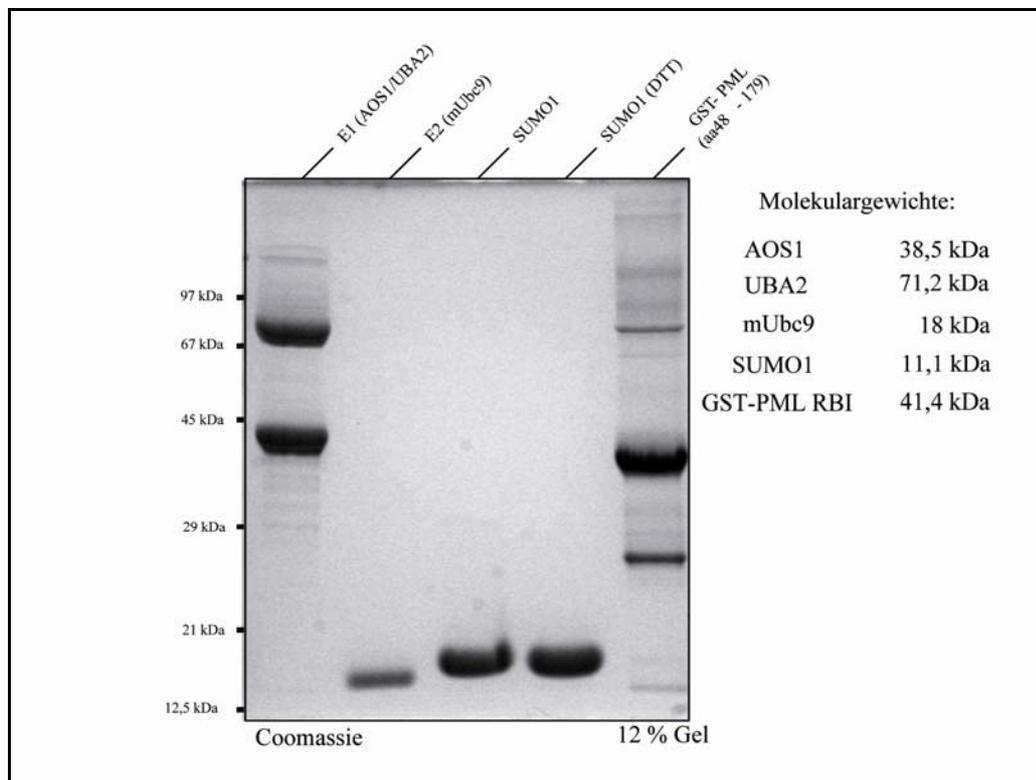


Abb. 3.1.1: Gereinigte Komponenten des SUMOylierungsapparates: Folgende Proteine wurden nach ihrer Reinigung auf ein 12 %-iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt: das E1 Heterodimer AOS1 (38,5 kDa) und UBA2 (71,2 kDa), das E2 mUbc9 (18 kDa), SUMO1 (11,1 kDa), einmal mit und einmal ohne DTT vor dem Probenauftrag aufgekocht, und GST-PML 48-179 (41,4 kDa).

Die Abbildung 3.1.1 zeigt ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel, das mit einzelnen gereinigten Komponenten des SUMOylierungsapparates beladen wurde. Gut zu erkennen ist, dass das E1 Heterodimer etwa äquimolare Mengen von AOS1 (untere Bande) und UBA2 (obere Bande) beinhaltet, da nach dem letzten Reinigungsschritt über die MonoQ-Säule nur Fraktionen mit vergleichbaren Mengen vereint wurden. Das E2-Enzym tritt hier als mUbc9 auf, da für die Nukleotidsequenz nicht das humane sondern das Mausgen als Matrize genutzt wurde. Auf der Ebene der Aminosäuren ist Ubc9 in beiden Spezies identisch. In der ersten SUMO1-Spur erkennt man, dass das 11,1 kDa große Protein ein für seine Größe untypisches Laufverhalten aufweist und bei etwa 20 kDa zu finden ist. SUMO1, das mit zusätzlichem DTT vor dem Probenauftrag aufgekocht wurde (vierte Spur) lief etwas fokussierter. Das als Substrat gereinigte GST-PML-RBI aa 48-179 umfasst die RING und die B-Box I Domänen (RBI) und somit die beiden SUMOylierungsstellen K65 und K160. Es weist noch Verunreinigungen auf. Bei der Bande auf der Höhe von ca. 26 kDa könnte es sich um freies GST handeln. In der Abbildung 3.1.2 sind alle GST-PML-Konstrukte aufgetragen, die während der vorliegenden Arbeit gereinigt wurden. Auf dem SDS-Gel sehen die Proteine größtenteils sauber gereinigt aus, das heißt es sind nicht viele Banden zu erkennen, die Verschmutzungen durch *E.coli*-Proteine oder verkürzte Formen der gereinigten PML-Konstrukte darstellen.

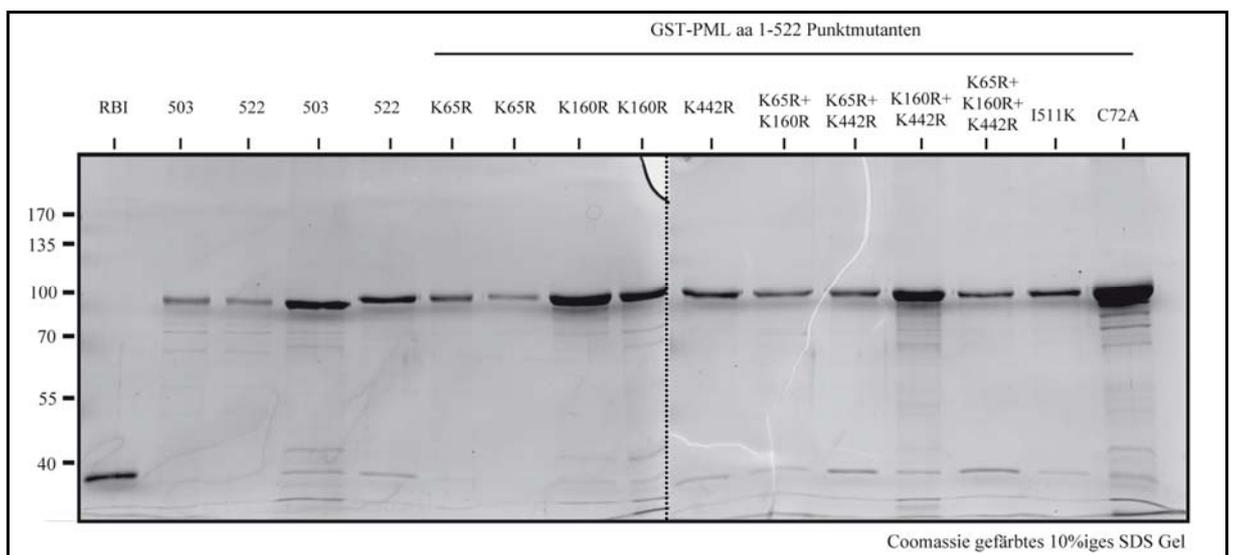


Abb. 3.1.2: Gereinigte PML-Konstrukte: Alle im Zuge dieser Arbeit gereinigten PML-Konstrukte sind nebeneinander auf ein SDS-Gel aufgetragen worden. Alle Proteine sind GST-markiert. GST-PML 1-503 und 1-522 sind je zweimal aufgetragen worden, da hier Chargen aus unabhängigen Reinigungen miteinander verglichen werden sollten. Ab Spur 6 wurden GST-PML 1-522-Konstrukte mit verschiedenen Punktmutationen (eine bis zu drei gleichzeitig) aufgetragen. K65R, K160R und K442R sind Mutationen des SUMOylierungsmotivs. I511K ist das SIM und bei C72A die RING-Domäne mutiert.

3.1.2 Untersuchung der *in vitro* SUMOylierung

Bei den ersten *in vitro* Untersuchungen sollte geprüft werden, ob die gereinigten SUMOylierungskomponenten unter ATP-Verbrauch die Substrate His-RanGAP1 und GST-PML-RBI aa 48-179 (PML RBI) modifizieren können (Abb. 3.1.3). In der Literatur wird RanGAP1 (65,5 kDa) als ein Modellsubstrat für die SUMOylierung beschrieben (Mahajan et al., 1998; Matunis et al., 1996). Abbildung 3.1.3 zeigt, dass die Antikörper für SUMO1 und SUMO2/3 spezifisch sind. Jeweils in der ersten und letzten Spur wurde gereinigtes SUMO1 oder SUMO2 aufgetragen und nur von den jeweiligen Antikörpern im Western Blot erkannt. In der Spur mit RanGAP1 zeigt sich auf der Höhe von ca. 70 kDa eine kreuzreaktive Bande

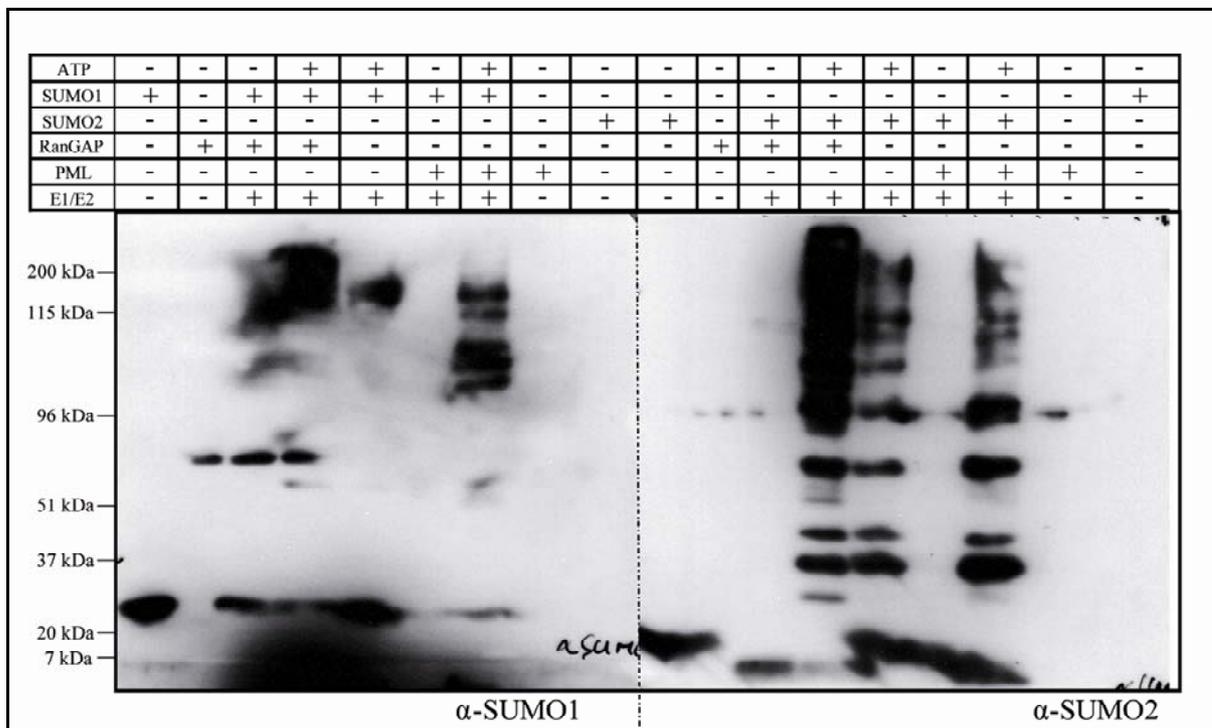


Abb. 3.1.3: Untersuchung der *in vitro* SUMOylierung: Western Blots der *in vitro* Untersuchung mit verschiedenen Substraten. Auf der linken Seite wurden die Substrate RanGAP1 und PML RB1 48-179 (PML) mit SUMO1, auf der rechten Seite mit SUMO2 modifiziert und jeweils mit den entsprechenden Antikörper für SUMO1 und SUMO2/3 detektiert. RanGAP und PML RB1 wurden als Substrate für SUMO1 Modifikation erkannt, während die SUMO2 Modifikation nicht spezifisch war. Eingesetzt wurden: SUMO1/2 90 μ M, E1 1,2 μ M, E2 50 μ M, Substrat 20 μ M, ATP 2 mM, kein ATP regenerierendes System; Reaktionspuffer: 20 mM HEPES pH 7,5; 50 mM NaCl; 2 mM MgCl₂

mit dem SUMO1-Antikörper, also etwa auf der Höhe des unmodifizierten Proteins. RanGAP1 erwies sich als gutes Substrat für die Modifikation mit SUMO1, denn nur mit Zugabe von ATP erschienen hochmolekulare Banden bei 200 kDa (Spur 4 im Vergleich zu Spur 3). In der Spur 5, in der kein Substrat aufgetragen wurde, zeigt sich eine Bande bei

ca. 120 kDa. Dabei handelt es sich vermutlich um modifiziertes E1. Diese Bande ist auch in Spur 7 zu erkennen, aber zusätzlich tauchen Spuren mit SUMO1-modifiziertem GST-PML RB1 auf. Bei der SUMOylierung mit SUMO2 zeigte sich, dass mit diesen gereinigten Proteinen RanGAP1 als einziges Protein eindeutig modifiziert wird. Da SUMO2 Ketten ausbilden kann, handelt es sich bei nicht aufgelösten Signalen zwischen 96 und 200 kDa vermutlich um polymodifiziertes RanGAP1. Bei PML RBI konnte im Vergleich zu dem Bandenmuster der Kontrollspur ohne Substrat kein Unterschied festgestellt werden. Bei dieser ersten Untersuchung der SUMOylierung zeigt sich, dass die Enzyme noch nicht in den richtigen Verhältnissen zugegeben wurden. Schon die allein aufgetragenen E1/E2 weisen ein starkes Bandenmuster unter Zugabe von ATP und SUMO2 auf (Spur 4 SUMO2 Blot).

In der Folge wurden Experimente mit anderen Proteinkonzentrationen durchgeführt (siehe Abb. 3.1.4). E1 und E2 wurden 12, bzw. 500fach geringer eingesetzt. Hier zeigte

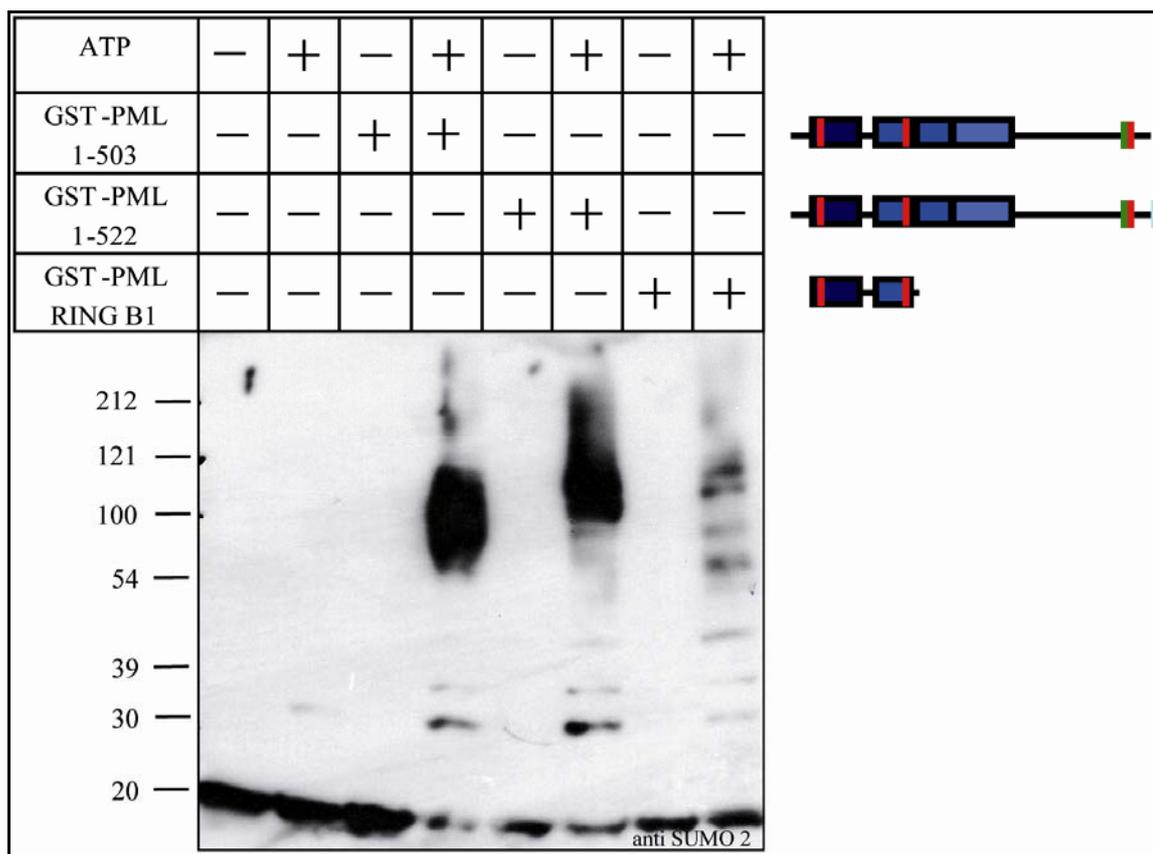


Abb. 3.1.4: Untersuchung der *in vitro* SUMOylierung mit SUMO2: Western Blot der SUMO2 Modifikation verschiedener PML Konstrukte, der mit SUMO2 Antikörper gefärbt wurde. Rechts oben sind die Domänenstrukturen der eingesetzten PML11 Konstrukte schematisch dargestellt (dunkelblau: RING; blau: B-Box; rot: SUMOylierungsstelle; grün: NLS; hellblau: SIM) Eingesetzt wurden: SUMO2 10 μ M, E1 0,1 μ M, E2 0,1 μ M, Substrat 2 μ M, ATP 1 mM, kein ATP regenerierendes System; Reaktionspuffer: 20 mM HEPES pH 7,5; 50 mM NaCl; 3 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT und 0,1% Tween 20.

sich, dass PML RBI durch SUMO2 ATP abhängig modifiziert wird (Spur 7 und 8). Das Bandenmuster der unspezifischen Reaktion, das sich in der Kontrolle ohne Substrat in Abbildung 3.1.3 zeigt (Spur 5 bei SUMO2), konnte durch die niedrigere Dosierung von E1 und E2 unterbunden werden. Hier wurden auch die längeren PML Konstrukte (GST-PML11 aa 1-503 *wt* und GST-PML11 aa 1-522 *wt*) in der *in vitro* SUMOylierung getestet. Diese Konstrukte umfassen das gesamte N-terminale TRIM und die dritte SUMOylierungsstelle (K442). Das längere dieser beiden Konstrukte beinhaltet außerdem das SIM. Man erkennt, dass beide Konstrukte gut mehrfach SUMOyliert werden, beim SIM enthaltenden PML 1-522 waren die hochmolekulare Banden im Vergleich zur kürzeren Variante zu höheren Molekulargewichten verschoben.

Das PML 1-522 Konstrukt erweist sich unter nochmals optimierten Bedingungen als ein sehr gutes Substrat für die SUMOylierung (Abbildung 3.1.5). Zwei unabhängig vonein-

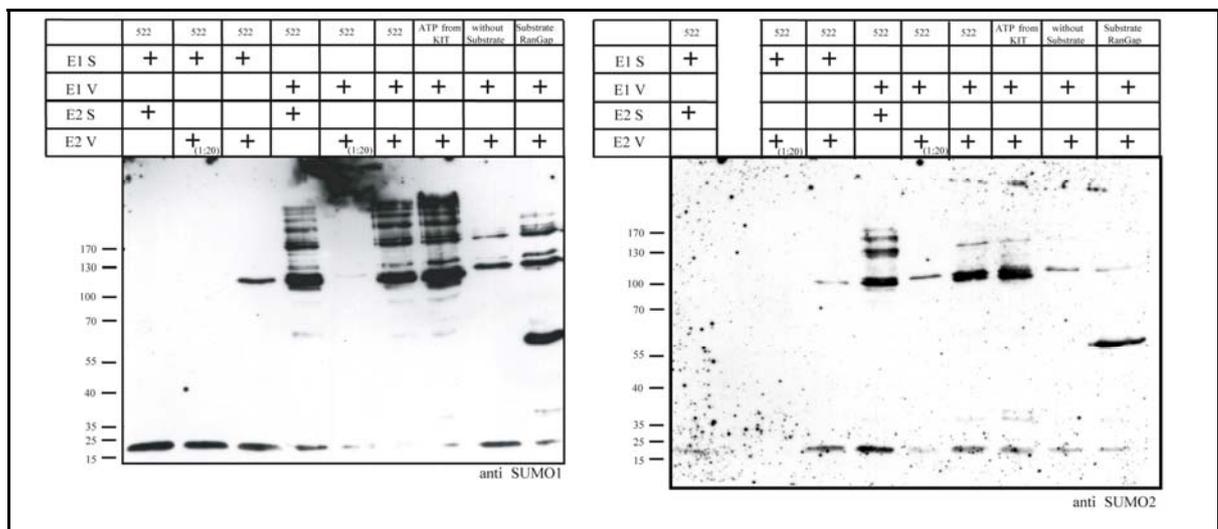


Abb. 3.1.5: Test verschiedener gereinigter E1- und E2-Enzyme: Die Aktivität von jeweils zwei verschiedenen Chargen von gereinigtem E1 (S und V) oder E2 (S und V) wurden mit GST-PML 1-522 als Substrat für SUMO1- (links) und SUMO2-Modifikation (rechts) getestet. Die Proteine wurden eingesetzt: SUMO1/2 1 µM, E1 70 nM, E2 10 nM, Substrat 800 nM, ATP 1 mM, mit ATP regenerierendem System; Reaktionspuffer: Transportpuffer (siehe 2.3.5.7).

ander gereinigte Chargen E1 und E2, genannt S und V, wurden in niedrigen Konzentrationen (E1: 10 nM, E2: 70 nM) eingesetzt. E1S zeigt in dieser Konzentration keine enzymatische Aktivität. Die anderen Chargen (E1V, E2S und E2V) sind hingegen in der Lage PML 1-522 mit SUMO1 zu modifizieren (Abb. 3.1.5 linkes Feld). Ein Bandenmuster im Bereich zwischen 100 kDa bis weit über 170 kDa ist nachzuweisen, wobei die Kombination aus E1V und E2V mit einer ATP-Lösung aus einem kommerziell erworbenen SUMOylierungssystem (Biomol) die stärkste SUMO1-Modifikation von PML 1-522 ermöglichte.

Bei der Modifikation von PML 1-522 mit SUMO2 (Abbildung 3.1.5 rechtes Feld) wurde die SUMOylierung von PML 1-522 durch die Chargen E1V und E1S am effizientesten vollzogen (Spur 5). Generell ist zu erkennen, dass die SUMO2-Modifikation unter den gleichen Bedingungen weniger effizient abläuft als die SUMO1-Modifikation. Unter Bedingungen, bei denen SUMO1 Modifikation noch sehr gut funktioniert (Spur 6 und 7 linkes Feld) zeigte sich bei SUMO2 nur eine sehr schwache Modifikation durch E1V und E2V mit unterschiedlichen ATP-Lösungen (Spur 7 und 8 rechtes Feld). In beiden Ansätzen, bei denen das E2V in 20-facher Verdünnung (500 pM) eingesetzt wurde (Spur 5 SUMO1, Spur 6 SUMO2), konnte keine SUMOylierung des Substrats nachgewiesen werden. Bei den Kontrollen ohne Substrat von E1V und E2V waren bei SUMO1 zwei schwächere Banden in den Höhen von etwa 120 und 170 kDa sichtbar, bei SUMO2 eine Bande auf etwa 120 kDa. Dabei könnte es sich um SUMO-modifiziertes E1 handeln. RanGAP1 wird unter diesen Bedingungen nur mit SUMO1 modifiziert (jeweils die letzten Spuren).

Mit Enzymen aus einem kommerziell erworbenen Baukastensystem zur SUMOylierung wurde PML 1-522 noch besser mit SUMO2 modifiziert (Abbildung 3.1.6). Im Vergleich

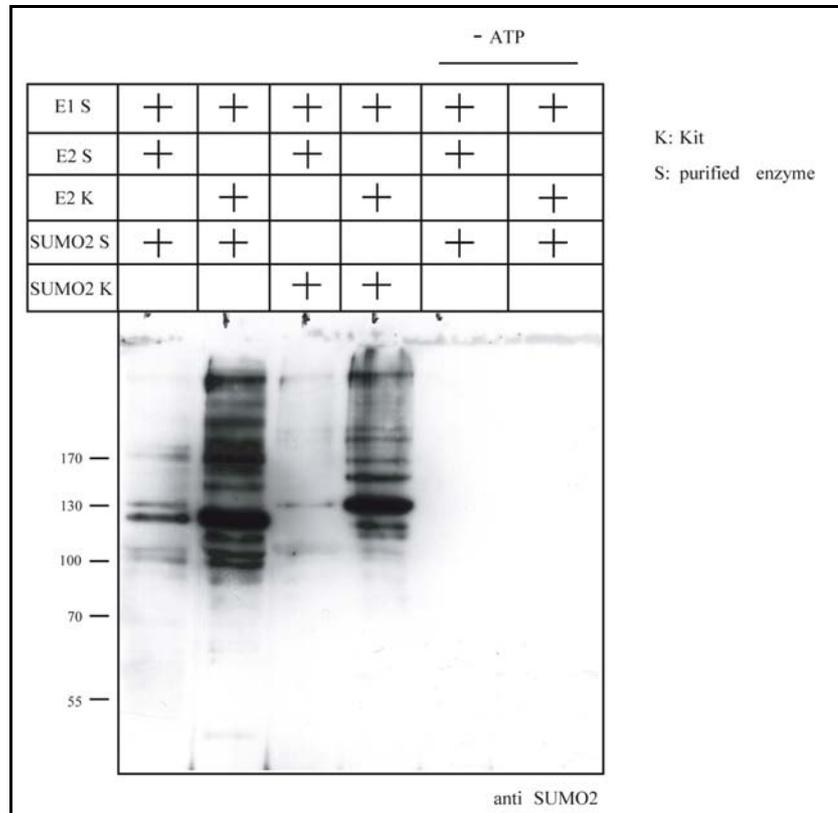


Abb. 3.1.6: Vergleich Baukasten- gegen gereinigte Enzyme: Eine Charge gereinigtes E1 (E1S) wurde mit Baukasten-Komponenten (K) oder gereinigten Proteinen mit GST-PML 1-522 als Substrat getestet. Eingesetzt hier: SUMO2 1 μ M, E1 70 nM, E2 10 nM, Substrat 800 nM, ATP 1 mM,

mit ATP regenerierendem System; Reaktionspuffer: Transportpuffer (siehe Material und Methoden).

zu den gereinigten Enzymen (Spur 1, 3), die PML 1-522 mit SUMO2 modifizieren können, ist das E2-Enzym des Systems aktiver, d.h. PML 1-522 ließ sich damit deutlich besser SUMOylieren (Spur 2 und 4). Ein starker Unterschied zwischen dem gereinigten SUMO2 und dem aus dem Baukastensystem ist nicht erkennbar. Das Bandenmuster der Spuren 3 und 4 ist im Vergleich zu den Spuren 1 und 2 aber leicht nach oben versetzt, was darauf schließen lässt, dass das kommerzielle SUMO noch eine Markierung von der Reinigung trägt. Die Kontrolle ohne ATP zeigt die Energieabhängigkeit der SUMO2-Modifikation (Spuren 5 und 6).

Weiter sollte getestet werden, ob PML 1-522 ein besseres Substrat für die SUMOylierung ist als PML 1-503, dem das C-terminale SIM fehlt oder als PML 1-522 K160R, dem die SUMOylierungsstelle des Lysin 160 fehlt (Abbildung 3.1.7 A und B). Es

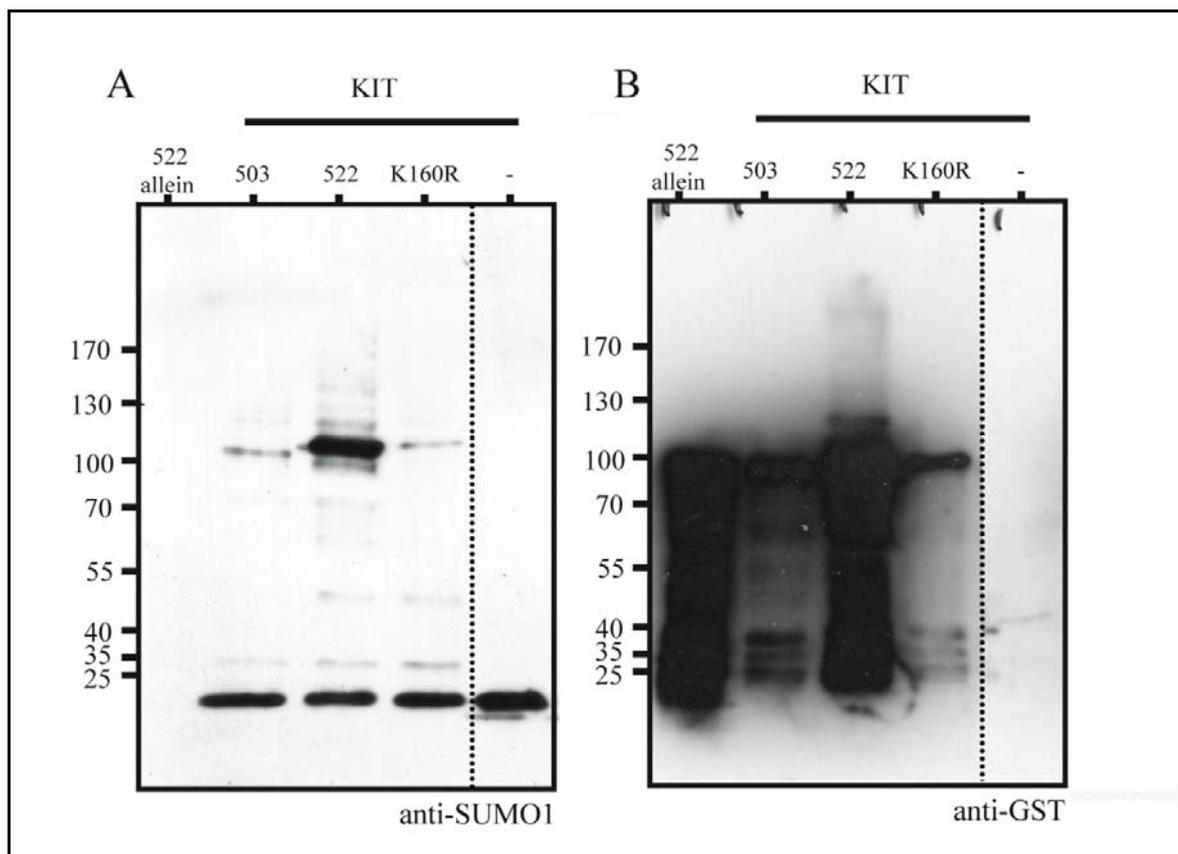


Abb. 3.1.7: Vergleich der SUMO1-Modifikation verschiedener PML-Konstrukte: GST-PML 1-522, GST-PML503 und GST-PML 1-522 K160R wurden als Substrat getestet. Das 1-522-Konstrukt mit intakten SUMOylierungsstellen und vorhandenem SIM wird am stärksten SUMOyliert (Western Blot anti-SUMO1 in A). In der ersten Spur ist als Kontrolle nur PML 1-522 aufgetragen, das keine Kreuzreaktivität mit dem SUMO1-Antikörper zeigt. Die Kontrolle ohne Substrat ist in Spur 5 aufgetragen. Eingesetzt hier: Substrat 800 nM, Komponenten des Baukastens nach Herstellerangaben. Der Western Blot in B ist mit GST-Antikörper behandelt. PML 1-522 zeigt hier einen hochmolekularen Schmier (über 120 kDa in Spur 3).

zeigte sich, dass PML 1-522 am stärksten mit SUMO1 modifiziert wird. Dabei muss aber beachtet werden, dass mehr PML 1-522 zu den Versuchen gegeben wurde als von den anderen beiden Konstrukten. In der Spur 3 des anti-SUMO1 Immunblots (3.1.7 A) ist ein Bandenmuster von 70 bis über 170 kDa erkennbar, wobei die prominenteste Bande auf der Höhe von ca. 110 kDa liegt. Bei den beiden anderen Konstrukten ist nur eine Bande, um 110 kDa klar zu sehen. Bei PML 1-522 sind 3 weitere schwache Banden zu erkennen, eine darunter und zwei darüber, die unterschiedlich SUMOylierte Formen des Konstrukts darstellen. Der anti-GST Immunblot (3.1.7 B) zeigt deutlich einen hochmolekularen Schmier über 110 kDa in der Spur 3, der aus mit unterschiedlich vielen SUMO1-modifizierten GST-PML 1-522 besteht. Anhand des GST-Western Blots ist erkennbar, dass die gereinigten Substrate, die ca. 100 kDa groß sein sollten, viele kürzere GST-markierte Abbauprodukte, bzw. in *E.coli* nicht vollständig translatierte PML-Konstrukte beinhalten, welche im Western Blot stärker zu sehen sind als im Coomassie (siehe Abb. 3.1.2). Weiter kann festgestellt werden, dass nur ein sehr geringer Teil des Substrates überhaupt umgesetzt wird.

Als Ergebnis der *in vitro* SUMOylierung kann zusammengefasst werden, dass eine SUMO-Modifikation mit gereinigten Proteinen etabliert worden ist. Mit Hilfe der gereinigten E1-, E2-Enzyme, SUMO1 sowie SUMO2 können verschiedene Substrate modifiziert werden, jedoch nicht mit der gleichen Aktivität wie mit dem kommerziell erwerblichen Baukastensystem. Außerdem zeigte sich, dass verschiedene PML-Konstrukte als Substrat für die *in vitro* SUMOylierung dienen. Dabei erwies sich GST-PML11 aa 1-522 *wt* (PML 1-522) als bestes *in vitro* Substrat sowohl für SUMO1 wie SUMO2.

3.2 Darstellung von eukaryotischen SUMO1- oder SUMO2-konjugierten Proteinen in *E. coli*

In diesem Teil der Arbeit sollte ein Expressionssystem etabliert werden, mit dessen Hilfe man *in vivo* SUMOyliertes Substrat reinigen kann. Dafür wurden alle Komponenten des SUMOylierungsapparates in zwei verschiedene Vektoren mit je zwei offenen Leserastern (ORF) kloniert (siehe Abschnitt 2.3.7) und in *E.coli*-Expressionsstämme transformiert. Anschließend erfolgte die Transformation des Substrat kodierenden Vektors und die Expression aller Komponenten in den Bakterien.

3.2.1 Expression von *in vivo*-SUMOylierten Substraten

Am Beispiel des PML-RBI aa 48-179 sollte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Expression von E1 (AOS1 und UBA2), E2 (mUbc9) und SUMO1 zusammen mit GST-PML-RBI zu einer *in vivo*-SUMOylierung dieses Substrates führt. Abbildung 3.2.1 zeigt eine Reinigung dieses SUMO1-modifizierten Substrats mittels GST-Affinitätschromatographie. Spur 1 des Western Blots in Abb. 3.2.1 A, der mit GST-Antikörper inkubiert wurde, zeigt das *E. coli*-Lysat vor der Reinigung. Bei ca. 40 kDa ist eine prominente Bande sichtbar, die auf der Höhe des unmodifizierten GST-PML-RBI läuft (Vergleich mit Spur 3, in der gereinigtes GST-PML-RBI als Kontrolle aufgetragen wurde). Zusätzlich sind noch schwächere Banden darüber (ca. 60 und 70 kDa) und darunter (ca. 30 kDa) zu erkennen. Der Vergleich mit dem über GSH-Sepharose gereinigten Protein in der vierten Spur (Eluat (+)) legt nahe, dass es sich bei den höheren

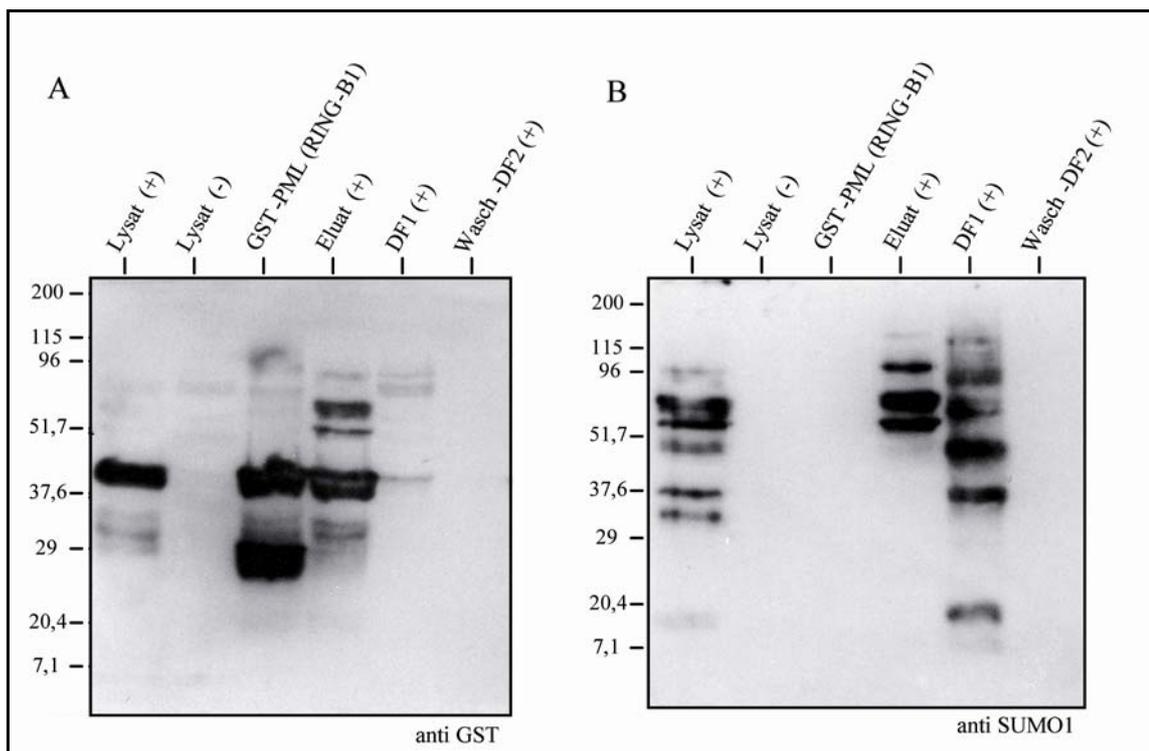


Abb. 3.2.1: Modifikation von GST-PML-RBI in *E. coli* mit Hilfe eines trimeren Vektorsystems: Western Blot gegen GST (A) und SUMO1 (B) von GST-PML-RBI (in den Vektor pET-Duet kloniert), das mit den Komponenten des SUMOylierungsapparates (E1, E2 und SUMO1 in den Vektoren pRSF-Duet und pCDF-Duet) in *E. coli* koexprimiert und anschließend durch GST-Affinitätschromatographie gereinigt wurde. (+): + 12 h IPTG; (-): - IPTG; DF1: Durchfluss 1 nach Auftragen der lysierten Zellen auf die GSH-Säule; Wasch-DF2: Durchfluss 2 nach waschen der GSH-Säule und der daran gebundenen Proteine vor der Elution.

Banden um SUMO1-modifiziertes GST-PML-RBI handelt, wo exakt diese hohen Banden zusammen mit der 40 kDa-Bande angereichert wurden. Den Beweis liefert der auf der in Abb. 3.2.1 B gezeigte Immunblot mit dem SUMO1-Antikörper. Hier wurden nur die oberen Banden der vierten Spur detektiert, das unmodifizierte PML Konstrukt auf der Höhe von 40 kDa jedoch nicht (Vergleich der Spuren 1, 3 und 4 in Abb. 3.2.1 A und B). Die schwachen Signale in Spur 5, die den Lysatdurchfluss (DF1) nach dem Auftragen auf die GSH-Säule enthält, belegen die Effizienz der Anreicherung des GST-Fusionsproteins.

Im Vergleich dazu zeigt der Lysatdurchfluss des Blot gegen SUMO1 ein Bandenmuster, das aus SUMO1 (bei 20 kDa) und modifizierten Proteinen besteht, während keine Banden mehr sichtbar sind, die mit den SUMO1-modifizierten GST-PML-RBI-Banden korrespondieren. Wahrscheinlich handelt es sich dabei vor allem um modifiziertes E1 oder E2 und um *E. coli*-Proteine die unter diesen Voraussetzungen modifiziert werden konnten. Die Lysat-Spur 2 auf den Immunblots zeigt, dass IPTG für die Induktion der Expression der auf den Vektoren kodierten Proteine essentiell ist.

3.3 SUMO-abhängiger Abbau von PML über das 26S Proteasom

Die posttranslationale Protein-Modifikation mit SUMO ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus innerhalb verschiedener zellulärer Prozesse. Zu Beginn dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass diese Modifikation nicht an der Ubiquitin-Markierung von verschiedenen Substraten und deren proteasomalen Abbau beteiligt ist, sondern eher antagonistisch dieser entgegenwirkt. Kristina Uzunova aus dem Labor von Prof. Jürgen Dohmen hat bei Arbeiten mit dem Modellorganismus Hefe eine Proteinfamilie entdeckt, die eine Verbindung zwischen der SUMO-Modifikation und dem darauf folgenden proteasomalen Abbau herstellt. Dieser Proteinfamilie wurde der Name ULS (*ubiquitin ligase for SUMO conjugates*) gegeben, da die zwei Vertreter (Ris1 (*roles in silencing 1*)/Uls1; Hex3/Slx8 (*hexose metabolism-related protein/synthetic lethal of unknown [x] function*)/Uls2) zum einen eine RING Domäne mit Ubiquitin-E3-Ligaseaktivität und mehrere SIMs (*SUMO interacting motif*) aufweisen. Durch Versuche mit verschiedenen Deletionsstämmen konnte gezeigt werden, dass hochmolekulare SUMO-Konjugate sowohl in Ubiquitin-E2-Deletionsstämmen ($\Delta Ubc4 + \Delta Ubc5$) als auch in ULS-Deletionsstämmen stabilisiert werden. Zudem zeigte sich, dass in wildtypischen Zellen die Inhibition des Proteasomes zu einer Akkumulation von gleichzeitig mit Ubiquitin- und SUMO-modifizierten Konjugaten führt (Uzunova et al., 2007). Aus diesem Grund ergab sich die

Fragestellung, ob dieser neuartige Mechanismus auch in höheren Lebewesen, z.B. dem Menschen, konserviert vorzufinden ist. Dabei spielte die Überlegung eine Rolle, ob SUMO isoformspezifisch in diesen Vorgang involviert ist und ob Unterschiede zwischen den kettenbildenden SUMO2/3-Isoformen und der SUMO1-Isoform zu detektieren wären.

3.3.1 Auswirkungen der Proteasominhibition auf SUMO-Konjugate in HeLa B-Zellen

Da es, wie in der Einleitung beschrieben (Abbildung 1.2.3), in der Hefe nur eine SUMO-Isoform gibt und diese befähigt ist Ketten auszubilden, sollte im Anschluss an die Versuche von Kristina Uzunova die Konjugation der verschiedenen humanen SUMO-Isoformen untersucht werden. Im Vergleich zu SUMO1 zeigen die fast identischen SUMO2- und SUMO3-Isoformen, die selbst eine konservierte SUMOylierungsstelle besitzen, ein unterschiedliches Bandenmuster im Western Blot (siehe Abb. 3.3.1).

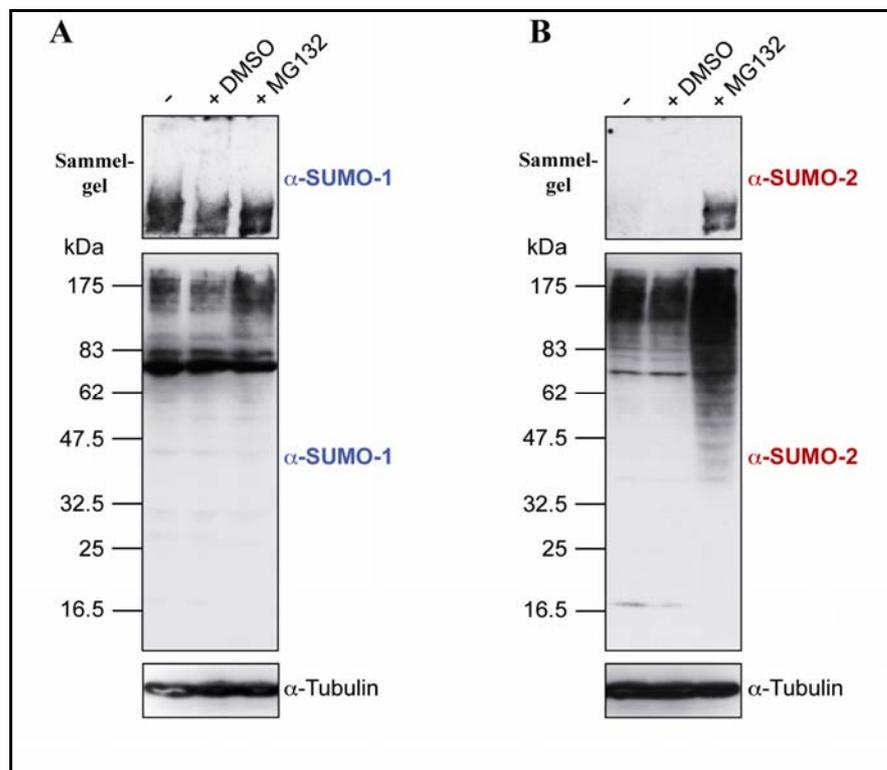


Abb. 3.3.1: Stabilisierung von SUMO2/3 Konjugaten durch Inhibition des Proteasoms: HeLa B-Zellen wurden unter drei unterschiedlichen Bedingungen für 8 h inkubiert: (-) ohne Behandlung; mit DMSO; und mit 20 μ M MG132 in DMSO gelöst. Nach TCA-Aufschluss wurden die Total-Lysate auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf Immunblots übertragen und mit spezifischen Antikörpern gegen SUMO1 (A) und SUMO2 (B) detektiert. Als Ladekontrolle wurden die Membranen nochmals mit einem Tubulinantikörper inkubiert. Geändert aus (Uzunova et al., 2007).

Während sich das Muster der hochmolekularen SUMO1-Konjugate durch Proteasominhibition durch MG132 im Vergleich zu unbehandelten oder nur mit DMSO behandelten Zellysaten nur geringfügig ändert (Abb. 3.3.1a), ist eine deutliche Stabilisierung von hochmolekularen SUMO2/3-Konjugaten zu erkennen (Abb. 3.3.1b). Zusätzlich erkennt man, dass SUMO1 *in vivo* fast vollständig in den hochmolekularen SUMO1-Konjugaten inkorporiert ist, da kein freies SUMO1 in der Höhe um 20 kDa detektiert wird. Bei der prominenten Bande um 80 kDa handelt es sich vermutlich überwiegend um SUMO1 modifiziertes RanGAP. Der SUMO2-Blot dagegen zeigt, dass ein gewisser Teil *in vivo* noch als Monomer vorliegt (3.3.1b), dieser Pool aber durch die Proteasominhibition verringert wird.

Als nächstes sollte in HeLa B-Zellen untersucht werden, wie verschiedene Stressfaktoren die konjugierbaren SUMO-Isoformen beeinflussen. Osmotischer und oxidativer Stress sind bekannt dafür, dass sie zu einer signifikanten Anreicherung von hochmolekularen SUMO2/3-Konjugaten führen und dass die SUMO1-Modifikation dagegen keine nennenswerte Veränderung zeigt (Saitoh and Hinchey, 2000). Diese Ergeb-

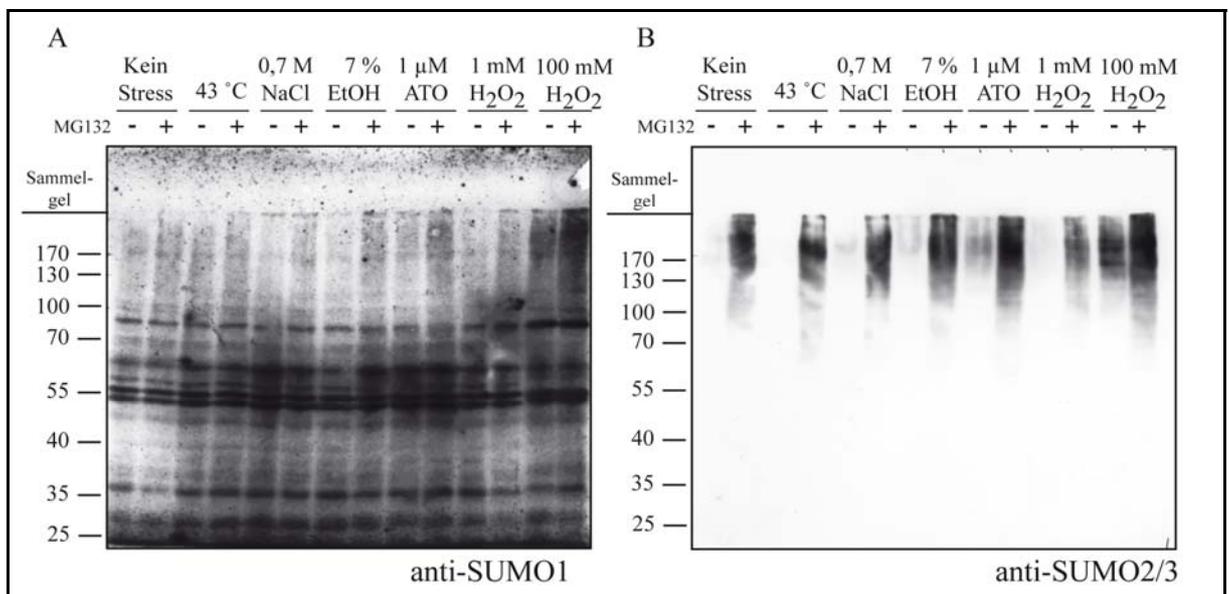


Abb. 3.3.2: Stressinduktion der SUMO-Konjugation in HeLa B-Zellen: HeLa B-Zellen wurden mit oder ohne MG132 für 6 h inkubiert (-/+) und 5 verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt: Hitze (43 °C; 15 min), osmotischer Stress (0,7 M NaCl; 15 min), Ethanol (7 % EtOH; 20 min), ATO (1 µM; 1h) und oxidativer Stress (1 mM oder 100 mM H₂O₂; 20 min). Die Analyse der SUMO Konjugation erfolgte nach TCA-Auflschluss mit Hilfe von Western Blots mit spezifischen Antikörpern (SUMO1 in A und SUMO2/3 in B).

nisse konnten in Abbildung 3.3.2 bestätigt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ATO in einer Konzentration, die dem Serumspiegel von therapierten APL-Patienten

entspricht, ebenfalls zu einer Stressantwort auf der Ebene der SUMO2/3-Konjugation führt. Die nach Stressinduktion auftretenden hochmolekularen SUMO2/3-Konjugate, können durch Proteasominhibition noch weiter verstärkt werden. Die stärkste Antwort auf Stress wird durch 100 mM Wasserstoffperoxid (H₂O₂) hervorgerufen. Eine 20-minütige Inkubation ohne Proteasominhibition (vorletzte Spur auf dem rechten Immunblot) führt zu einer Akkumulation von SUMO2-Konjugaten, die der in Zellen ohne Stress unter Proteasominhibition entspricht. Im Gegensatz zur Literatur wurde keine Akkumulation von SUMO2/3 Konjugaten nach Hitzestress bei 43 °C nachgewiesen.

Um zu überprüfen, ob sich transfizierte FLAG-SUMO-Isoformen unter vergleichbaren Bedingungen ähnlich verhalten wie endogene Proteine, wurden HeLa B-Zellen mit einem Leervektor oder mit FLAG-markierten SUMO1, SUMO3 oder der mutierten Variante SUMO3 K11R transfiziert. (Abbildung 3.3.3). Die Analyse des mit FLAG-Antikörper be-

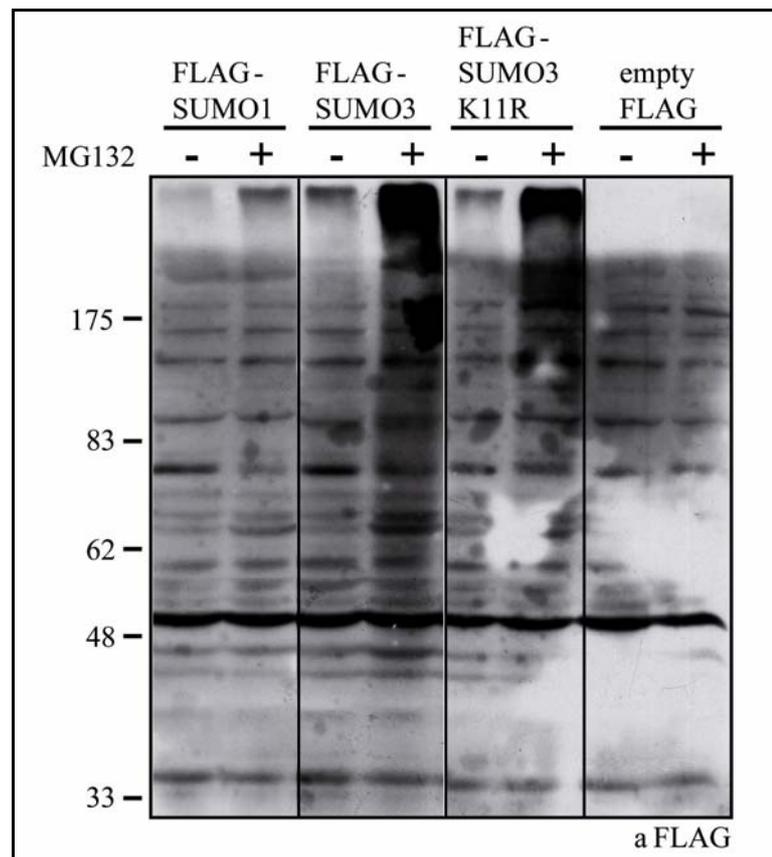


Abb. 3.3.3: Akkumulation von FLAG-SUMO-Konjugaten in transient transfizierten Zellen: HeLa B-Zellen wurden mit 4 verschiedenen Vektoren (pCMV2b-Leer, -SUMO1, -SUMO3 und -SUMO3 K11R) transient transfiziert und nach 24 h mit oder ohne MG132 für 8 h inkubiert (-/+). Anschließend wurden die Zellysate nach TCA-Auflschluss mittels eines FLAG-Antikörpers im Western Blot analysiert. Die transient transfizierten FLAG-SUMO-Konstrukte verhalten sich nach Proteasominhibition ähnlich wie endogene SUMO-Isoformen.

handelten Western Blots zeigte vor allem bei den SUMO3-Konstrukten eine Anhäufung hochmolekularer FLAG-SUMO3-Konjugate. Die stärkste Akkumulation erfolgt mit dem wildtypischen FLAG-SUMO3, aber auch Konjugate von FLAG-SUMO3 K11R-, das nicht mehr zur Ausbildung von Ketten befähigt ist, können durch die Inhibition angereichert werden. Auch FLAG-SUMO1 zeigt unter diesen Bedingungen im Vergleich zur Leervektorkontrolle (*empty* FLAG) eine leichte Anreicherung von hochmolekularen Konjugaten durch MG132-Behandlung, die aber nur das Niveau der unbehandelten FLAG-SUMO3-Zellen erreicht.

Die Akkumulation hochmolekularer SUMO-Konjugate nach Proteasominhibition legt in Analogie zu den Befunden aus der Hefe (siehe Abschnitt 3.3) die Existenz von gemischten Ubiquitin/SUMO Konjugaten nahe. Um diese nachzuweisen wurden HeLa B-Zellen analog dem Experiment in Abbildung 3.3.3 mit einem Kontrollvektor, mit FLAG-SUMO1- oder mit einem FLAG-SUMO3-Vektor transfiziert (Abbildung 3.3.4), mit Prote-

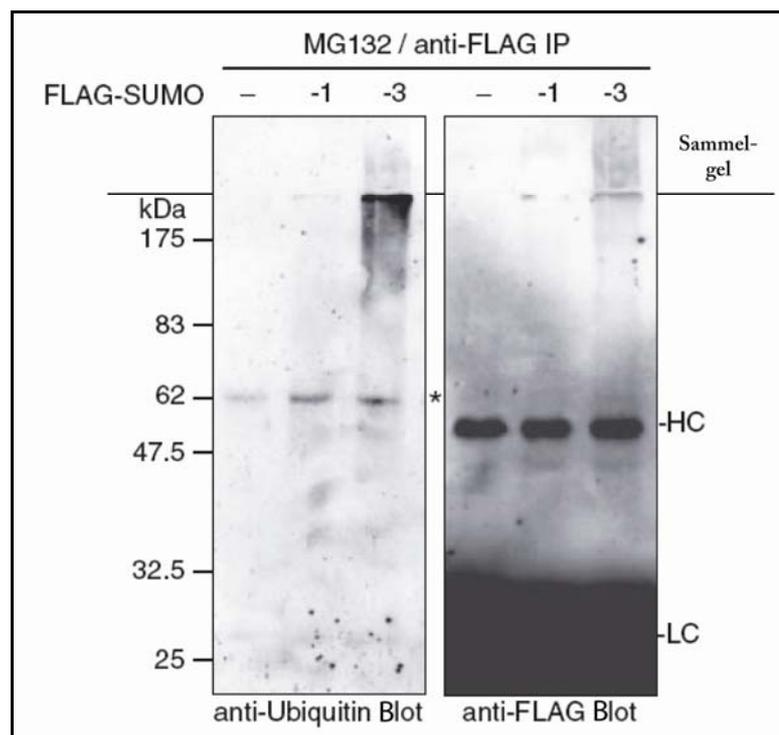


Abb. 3.3.4: Nachweis von gemischten Ubiquitin/SUMO-Konjugaten: HeLa B-Zellen wurden mit einem von drei verschiedenen Vektoren (pCMV2b-Empty; pCMV2b-SUMO1 und pCMV2b-SUMO3) transfiziert und für 8 h mit MG132 inkubiert. Nach anschließendem TCA-Aufschluss wurden die Zelllysate durch Prof. Jürgen Dohmen weiterverarbeitet. Es folgte ein anti-FLAG IP und die Immunblot-Analyse mit Antikörpern gegen Ubiquitin (links) und FLAG (rechts). Dieser Versuch wurde zusammen mit Prof. Jürgen Dohmen durchgeführt. Aus (Uzunova *et al.*, 2007).

asominhibitor inkubiert und die Zellen aufgeschlossen. Das Lysat wurde dann mit Hilfe einer FLAG-Affinitätsreinigung (Abschnitt 2.4.8) gereinigt und mittels FLAG- und

Ubiquitinantikörpern im Western Blot analysiert. Es konnten sowohl für SUMO1 als auch für SUMO3 gemischte Ubiquitin/SUMO-Formen nachgewiesen werden. Die stärkere Akkumulation von SUMO3-Konjugaten nach Proteasominhibition führt zu einer viel stärkeren Anreicherung von ubiquitinierten SUMO3-als SUMO1-Konjugaten.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass insbesondere SUMO2/3-Konjugate unter die proteolytische Kontrolle des Ubiquitin/Proteasom-Systems fallen. Somit existiert in Säugetierzellen ein ähnlicher Mechanismus für die Kontrolle von SUMO-Konjugaten wie er von Kristina Uzunova *et al.* in Hefe identifiziert wurde. Dieser Mechanismus wirkt sich in Säugerzellen nicht in gleichem Maße auf SUMO1-Konjugate aus.

3.3.2 PML als Substrat für die SUMO2/3-abhängige proteolytische Kontrolle

Zur Untersuchung der physiologischen Rolle des SUMO-abhängigen Abbaus ubiquitiniertes Proteine über das 26S Proteasom müssen spezifische Substrate für diesen Abbauweg identifiziert werden. PML war ein viel versprechender Kandidat, da zellulärer Stress wie ATO die Bildung von hochmolekularen SUMO2/3-Konjugaten fördert (siehe Abb. 3.3.2), PML als gutes SUMO-Substrat gilt und es nach ATO-Behandlung proteasomabhängig abgebaut wird (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde ein PML Konstrukt, FLAG-PML 1-522 *wt*, in HeLa B-Zellen zusammen mit SUMO-Isoformen transfiziert, mit ATO und/oder MG132 behandelt und mittels Western Blot analysiert (Abbildung 3.3.5). Dieses Konstrukt besitzt alle relevanten N-terminalen Bereiche der nukleären PML-Isoformen und des PML-RAR α -Fusionsproteins (RBCC, NLS, drei SUMOylierungsstellen K65, 160 und 442 sowie ein SIM, siehe Einleitung Abschnitt 1.1.2),

Zusätzlich wurde auch ein PML-Konstrukt getestet, bei dem die SUMOylierungsstelle K160 in ein Arginin ausgetauscht wurde (K160R). Lallemand-Breitenbach *et al.* haben beschrieben, dass die Mutation dieser SUMOylierungsstelle den Proteasom-abhängigen Abbau unterbindet (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2001).

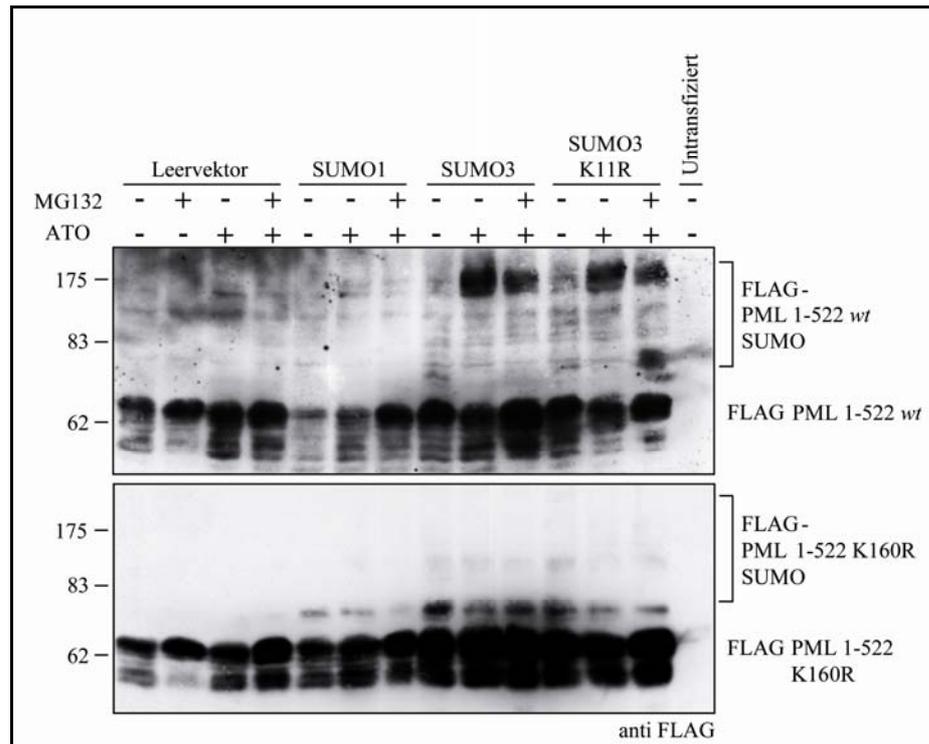


Abb. 3.3.5: Einfluss von ATO auf transfiziertes PML bei koexprimierten SUMO-Isoformen: Zellen wurden mit einem von vier verschiedenen Vektoren (pCMV3b-Empty; pCMV3b-SUMO1, pCMV3b-SUMO3 und pCMV3b-SUMO3 K11R) zusammen mit FLAG-PML 1-522 *wt* (oberes Feld) oder K160R (unteres Feld) transfiziert und für 8 h mit MG132 und/oder ATO inkubiert. Nach anschließendem TCA-Aufschluss wurden die Zelllysate mittels Immunblot mit einem FLAG-Antikörper analysiert. Jeweils in der letzten Spur ist ein untransfiziertes unbehandeltes Lysat als Kontrolle geladen. In Gegenwart von Myc-SUMO3 oder Myc-SUMO3 K11R bilden sich unter ATO-Einfluss hochmolekulare PML-Konjugate im Bereich von ca. 170 kDa, die in der Leervektor-Kontrolle und in Myc-SUMO1 transfizierten Zellen nicht auftreten. Die Mutation K160R von PML verhindert die Ausbildung dieser hochmolekularen Konjugate (unteres Feld).

Auf dem anti-FLAG Western Blot ist zu beobachten, dass FLAG-PML 1-522 *wt* nach 8-stündiger Inkubation mit ATO je nach koexprimierter SUMO-Isoform unterschiedlich reagiert. Bei der Kontrolle mit koexprimiertem Leervektor zeigt sich in Gegenwart von ATO eine Doppelbande in der Höhe zwischen ~ 90 und 150 kDa, die in unbehandelten oder mit MG132 behandelten Zellen nicht vorkommt. Wird SUMO3 oder SUMO3 K11R koexprimiert erscheint eine deutliche breite Bande in der Region von ~ 170 kDa, die in SUMO1 koexprimierenden Zellen nicht zu sehen ist. Wird zusätzlich zu ATO auch MG132 zu den Zellen gegeben, so erscheint diese prominente Bande etwas weniger stark. Bei etwa 70 kDa erkennt man bei der mutierten PML-Variante PML 1-522 K160R in allen mit SUMO kotransfizierten Zelllysaten eine Bande, die nicht in der Leervektorkontrolle erscheint, bei SUMO1 jedoch schwächer als bei SUMO3 und SUMO3 K11R. Des Weiteren konnten keine hochmolekularen Formen nachgewiesen werden und es gibt keinen Einfluss durch die Behandlung mit ATO und MG132 auf das Bandenmuster von FLAG-PML 1-522 K160R. Die starke Stimulation der Modifikation von PML durch ATO

vor allem mit SUMO2/3 kann ein Indiz dafür sein, dass diese Konjugate eine Vorstufe für den Proteasom-abhängigen Abbau darstellen.

Um diese Interpretation näher zu untersuchen wurden in der Folge T-RexTM HeLa-Zelllinien verwendet, die stabil mit durch Doxycyclin induzierbaren MRGS-His₆-markierten SUMO-Isoformen oder einem Kontrollvektor (Leervektor) transfiziert worden waren (Meinecke, 2008). Zu Beginn musste getestet werden ob diese Zelllinien, die freundlicherweise von Anke Krause (geborene Meinecke) aus unserem Labor nach Fertigstellung zur Verfügung gestellt wurden, ähnlich wie wildtypische Zellen auf Proteasominhibition reagieren (Abbildung 3.3.6).

Nach der Behandlung der Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 akkumulieren sowohl Ubiquitin- als auch His₆-SUMO-Konjugate in allen drei His₆-SUMO-Zelllinien (His₆-SUMO1, 2 und 3) (Abbildung 3.3.6 A). Dieses Ergebnis ist konsistent mit den vorigen Untersuchungen an HeLa B-Zellen und zeigt, dass SUMO-Konjugate für den Abbau über das Ubiquitin/Proteasom-System (UPS) markiert werden können. Der Nachweis der SUMO-Isoformen mit spezifischen Antikörpern zeigt, dass His₆-SUMO exprimierende Zelllinien einen höheren Grad an SUMO-Konjugaten in unbehandelten Zellen aufweisen als die Kontroll-Zelllinie (Abbildung 3.3.6 B). Diese Akkumulation von SUMO-Konjugaten wird durch MG132-Behandlung noch weiter gesteigert. Die Akkumulation von Ubiquitin-Konjugaten ist in allen vier Zelllinien nicht unterscheidbar. Die endogenen SUMO2/3-Konjugate akkumulieren auch in der Kontroll- und der His₆-SUMO1 exprimierenden Zelllinie, wohingegen sich endogene SUMO1-Konjugate nicht in der Kontroll- oder den SUMO2/3-Zelllinien anreichern.

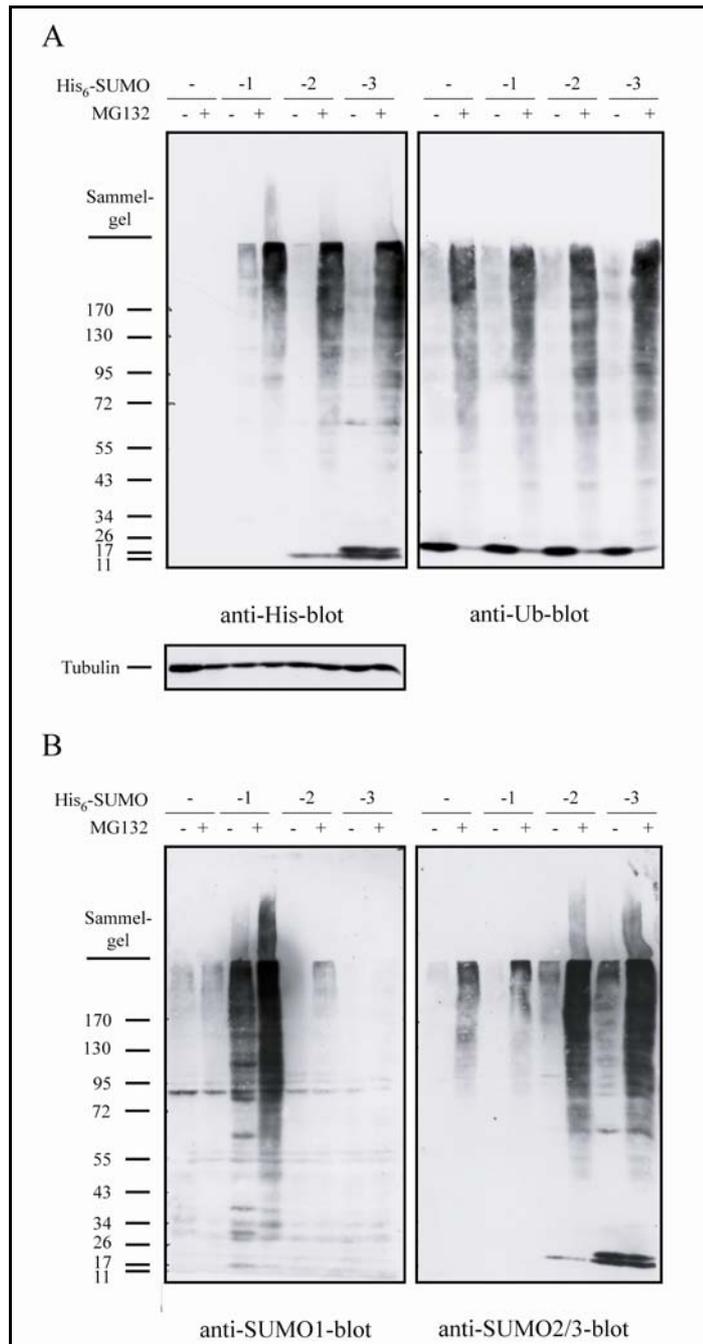


Abb. 3.3.6: Akkumulation von SUMO-Konjugaten in stabilen Zelllinien nach Proteasominhibition: Gesamtlysate von stabil transfizierten T-RexTM HeLa-Zellen wurden nach His₆-SUMO Induktion und Behandlung für 6 h mit oder ohne MG132. auf separaten SDS-Gelen geladen und anschließend mittels Western Blot mit Antikörpern gegen RGS-His, Ubiquitin (in A), sowie SUMO1 und SUMO2/3 (in B) analysiert. Als Kontrolle der Ladung diente der anti-Tubulin Immunblot.

Für die Untersuchung der SUMO-abhängigen Ubiquitinierung von PML wurde das gleiche FLAG-PML 1-522 *wt*-Konstrukt wie in Abbildung 3.3.5 verwendet. Dieses Konstrukt wurde transient in die vier verschiedenen stabilen Zelllinien transfiziert und die Zellen 24 h später mit ATO, MG132 oder beidem behandelt (Abbildung 3.3.7).

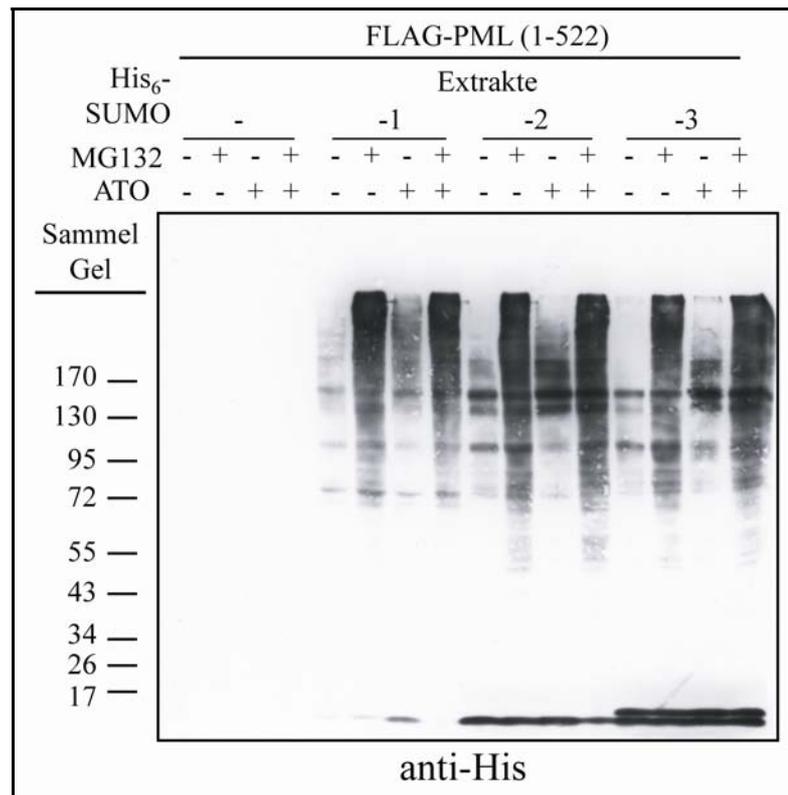


Abb. 3.3.7: Akkumulation von His₆-SUMO-Konjugaten in stabilen Zelllinien nach Behandlung mit ATO und MG132: T-RexTM HeLa-Zelllinien, die neben Doxycyclin induziertem His₆-SUMO auch transient transfiziertes FLAG-PML 1-522 *wt* exprimieren, wurden mit ATO (6 h) und/oder MG132 (3h) behandelt. Die Lysate wurden nach TCA-Auflschluss auf SDS-Gelen geladen und anschließend mittels Western Blot mit Antikörper gegen RGS-His analysiert. Vornehmlich in den SUMO2 und SUMO3-Zelllinien zeigen sich, durch ATO verstärkt, prominente Banden im hochmolekularen Bereich zwischen 100 und 170 kDa, die in untransfizierten Zellen (siehe Abb. 3.3.6 A) nicht vorkommen.

Die Behandlung mit ATO allein führt zu einer schwächeren Akkumulation von His-SUMO-Konjugaten als mit MG132 oder der Kombination beider Substanzen. Im Vergleich zu den stabilen Zelllinien, die kein transfiziertes FLAG-PML exprimieren, zeigen sich ausgeprägte Banden in den hochmolekularen Bereichen zwischen 100 und 170 kDa als Antwort auf eine ATO-Behandlung, vor allem in den His₆-SUMO2- und His₆-SUMO3-Zelllinien (Vergleich unbehandelte His₆-SUMO2 und 3 in 3.3.7 zu unbehandelten Lysaten im anti-His Western Blot dieser Zelllinien in Abb. 3.3.6). Die Kombination von MG132 und ATO führt zu einer Addition der einzelnen Behandlungseffekte, man erkennt also sowohl das Bandenmuster der einfachen ATO-Behandlung und zusätzlich auch die typische Akkumulation hochmolekularer Konjugate durch Proteasominhibition.

Parallel zu diesem Experiment untersuchte Helen Springer im Zuge ihrer Bachelorarbeit den Einfluss von ATO und MG132 auf das Bandenmuster von endogenem PML in der Kontrolllinie der T-RexTM HeLa-Zellen. Um die Expression der endogenen

PML-Isoformen zu steigern behandelte sie die Zellen über einen Zeitraum von 24 h mit IFN γ . Abbildung 3.3.8 zeigt einen Immunblot der mit PML-Antikörper inkubiert wurde.

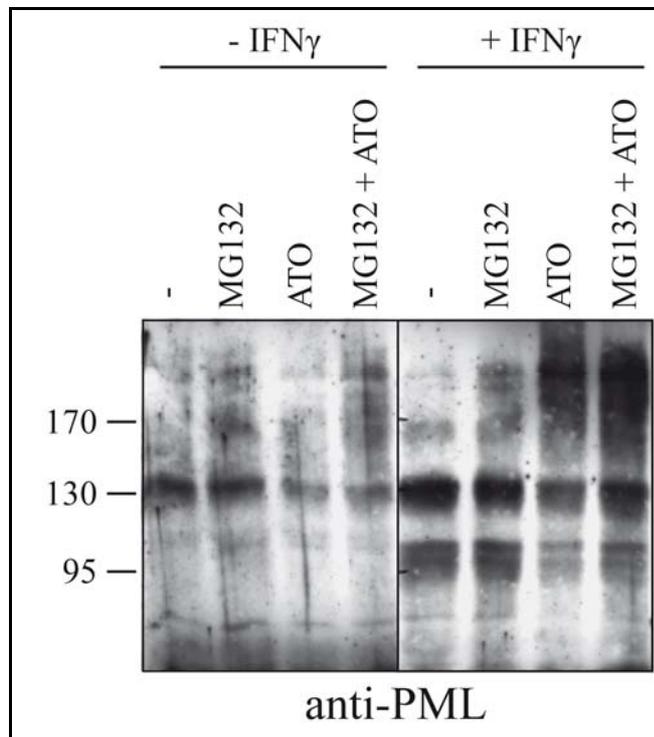


Abb. 3.3.8: Einfluss von ATO auf endogenes PML: Endogenes PML in T-RexTM HeLa-Zellen mit stabil transfi-ziertem Leervektor wird im Westernblot durch PML-Antikörper detektiert. Links Zellen ohne, rechts Zellen die mit IFN γ behandelt wurden. Durch ATO kommt es zu einer Akkumulation hochmolekularer PML-Konjugate und zu einer Verminderung der PML-Banden zwischen 95 und 130 kDa. IFN γ : 30 h; ATO: 6 h; MG132: 3 h. Dieses Experiment wurde von Helen Springer durchgeführt, verändert aus: (Weisshaar et al., 2008).

Zu erkennen ist, dass ähnlich wie von Lallemand-Breitenbach gezeigt (Lallemand-Breitenbach et al., 2001), ATO-Behandlung zum Auftreten höher molekularer PML-Formen führt, und außerdem die Menge an niedermolekularem PML vermindert wird. Zusätzliches MG132 führt zur stärkeren Akkumulation hochmolekularer PML-Formen.

Diese Ähnlichkeit zwischen dem hochmolekularen Bandenmusters von endogenem PML, das auf ATO reagiert und dem Muster der His6-SUMO-Banden in den mit PML transient transfizierten Zellen wurde deshalb eingehender untersucht: Abbildung 3.3.9 zeigt zwei Western Blots mit Proben, die vor (A, mit FLAG-Antikörper) und nach einer FLAG-Affinitätsreinigung (B, mit RGS-His-Antikörper) analysiert wurden. Die His₆-SUMO2 und -3 exprimierenden Zellen mit transfiziertem FLAG-PML 1-522 *wt* offenbaren

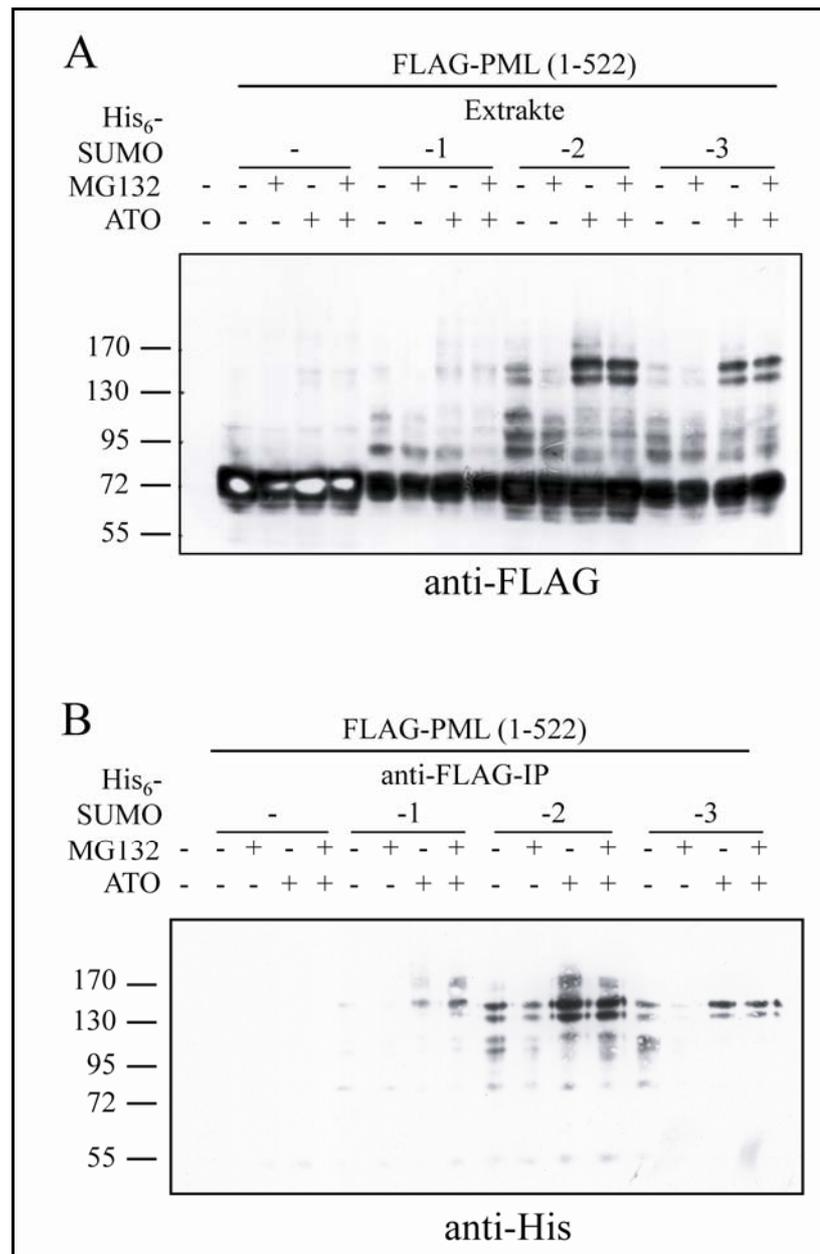


Abb. 3.3.9: Akkumulation von hochmolekularen PML-Konjugaten nach ATO-Behandlung: A: Analog zu Abbildung 3.3.7, diesmal anti-FLAG Immunblot und eine zusätzliche Kontrolle mit untransfizierten Zellen in Spur 1. Banden im hochmolekularen Bereich zwischen 100 und 170 kDa, am deutlichsten die Doppelbande unter 170 kDa, akkumulieren vor allem in His₆-SUMO2 und -3 Zellen als Antwort auf ATO. Bei 72 kDa läuft das unmodifizierte FLAG-PML 1-522 wt. B: Die FLAG-Affinitätsreinigung zeigt, dass es sich bei den hochmolekularen PML-Formen vor allem um SUMO2/3 modifiziertes PML handelt. Diese Modifikation wird durch ATO verstärkt. Verändert nach (Weisshaar et al., 2008).

im FLAG Immunblot nach ATO-Behandlung ein ähnlich ausgeprägtes Bandenmuster im Bereich von 100-170 kDa wie zuvor im Anti-His Western Blot (siehe Abb. 3.3.7). Auch hier zeigt sich ein Unterschied zu den Leervektor- und den SUMO1-Zellen, bei denen diese prominenten Banden nicht, bzw. sehr schwach auftreten. Dass es sich bei diesen hochmolekularen Banden im Bereich zwischen 100 und 170 kDa tatsächlich um mit SUMO2/3-modifiziertes PML handelt und ATO eben diese Modifikation induziert,

beweist der anti-His Westernblot in 3.3.9 B. Nach einer FLAG-Affinitätsreinigung des transfizierten PML, können exakt diese Banden dokumentiert werden.

Der anti-FLAG Immunblot zeigt außerdem, dass die Überexpression von His₆-SUMO2 oder His₆-SUMO3 allein schon zum Erscheinen einer schwachen Doppelbande zwischen 130 und 170 kDa von SUMO-modifiziertem FLAG-PML 1-522 *wt* in unbehandelten Zellen führt. Diese Doppelbande schwächt sich ab, bzw. verschwindet bei den His₆-SUMO3-Zellen gänzlich, wenn nur MG132 zugegeben wird. Die Doppelbande tritt aber sowohl in der His₆-SUMO2- als auch in der His₆-SUMO3-Zelllinie am stärksten auf, wenn über einen Zeitraum von 6 h 1 µM ATO zugegeben wurde.

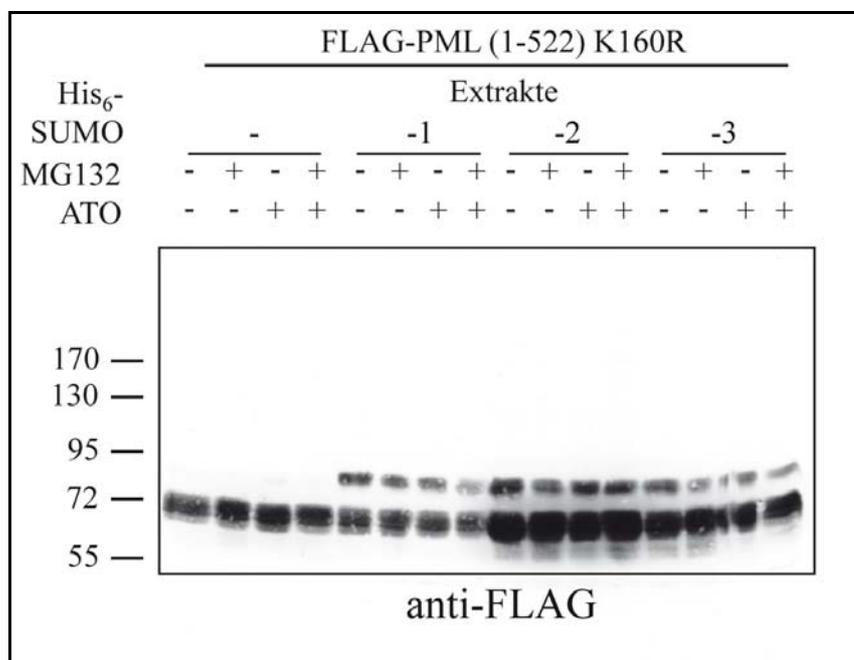


Abb. 3.3.10: Die SUMOylierungsstelle K160 ist essentiell für die ATO-Antwort von PML: Stabile T-RexTM HeLa -Zellen wurden mit FLAG-PML 1-522 K160R transfiziert und analog Abbildung 3.3.9 A) behandelt. Es werden keine hochmolekularen Banden in Bereichen höher als 95 kDa im anti-FLAG Western Blot nachgewiesen.

Wie zuvor erwähnt, konnte gezeigt werden, dass der ATO-abhängige Abbau von PML durch Mutation der SUMOylierungsstelle K160 blockiert werden kann (Abbildung 3.3.5 und (Lallemand-Breitenbach et al., 2001)). Wird analog zur Abbildung 3.3.9 anstelle des wildtypischen das FLAG-PML 1-522 K160R transfiziert und mittels eines anti-FLAG Immunblots analysiert (Abbildung 3.3.10), so kann die prominente Doppelbande zwischen 130 und 170 kDa auch bei den His₆-SUMO2 und -3-Zellen nicht nachgewiesen werden. Generell zeigt diese PML-Mutante bis auf eine Bande in der Höhe von 95 kDa, die in allen His₆-SUMO exprimierenden T-RexTM Zellen und unabhängig von der Behandlung mit

oder ohne ATO, bzw. MG132, erscheint, keine hochmolekularen Banden. Somit reguliert die Modifikation am Lysinrest 160 das Verhalten von PML unter Einfluss von ATO.

Da in den bisherigen Untersuchungen in den stabilen SUMO-Zelllinien immer ein verkürztes PML-Konstrukt (PML 1-522) verwendet wurde, das alle wichtigen N-terminalen Bereiche beinhaltet, sollte auch das Verhalten wildtypischer Isoformen mit vollständigen C-Termini auf ATO-Behandlung untersucht werden. Dafür wurden die PML-Isoformen PML6 und PML11 in den pCMV-2b-Vektor kloniert und anschließend in die vier Zelllinien (Empty, His₆-SUMO1, -2 und -3) transient transfiziert (Abbildung 3.3.11). Zur Kontrolle wurde das FLAG-PML 1-522 *wt*-Konstrukt ebenfalls transfiziert. In den vier anti-FLAG Western Blots (3.3.11 A-D) ist zu erkennen, dass sich die vollständigen PML-Isoformen FLAG-PML6 (aa 1-633) und FLAG-PML11 (aa 1-781) in den vier Zelllinien ähnlich verhalten wie das Konstrukt FLAG-PML 1-522 *wt*. Unmodifiziertes PML6 läuft auf der Höhe von 95 kDa, PML11 auf der Höhe von ca. 100 kDa, das bisher verwendete PML 1-522 *wt* bei 72 kDa. In den Kontroll-Zellen in 3.3.11 A zeigen alle PML-Konstrukte nur diese unmodifizierten Banden, unabhängig von der Behandlung der Zellen mit ATO oder MG132. In der SUMO1-Zelllinie zeigen PML 1-522 *wt* und PML6 Banden, die jeweils ca. 20 kDa über den unmodifizierten Formen liegen, wobei bei ATO-Behandlung diese Bande schwächer wird, bzw. verschwindet. PML11 zeigt hier keinen Unterschied zur Kontroll-Zelllinie. Die Bandenmuster auf den Immunblots der transfizierten SUMO2- und SUMO3-Zelllinie unterscheiden sich nicht voneinander aber von den beiden anderen Zelllinien (3.3.11 C und D). Auch hier weist FLAG-PML 1-522 *wt* wieder unter ATO-Einfluss eine Doppelbande in der Höhe zwischen 130 und 170 kDa auf. Eine vergleichbare Doppelbande tritt auch bei PML6 und PML11 auf. Die Bande die 20 kDa über dem unmodifizierten PML läuft ist wie in B wieder zu erkennen und wird durch ATO-Behandlung stark abgeschwächt. Zusammengefasst zeigen also PML6 und PML11 die gleiche Reaktion auf ATO in den verschiedenen Zelllinien wie PML 1-522 *wt*. Somit können die Daten, die mit der verkürzten Version FLAG-PML 1-522 *wt*, auch auf die vollständigen Isoformen PML6 und PML11 übertragen werden.

Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass PML durch ATO Behandlung vornehmlich mit SUMO2 und/oder SUMO3 modifiziert wird.

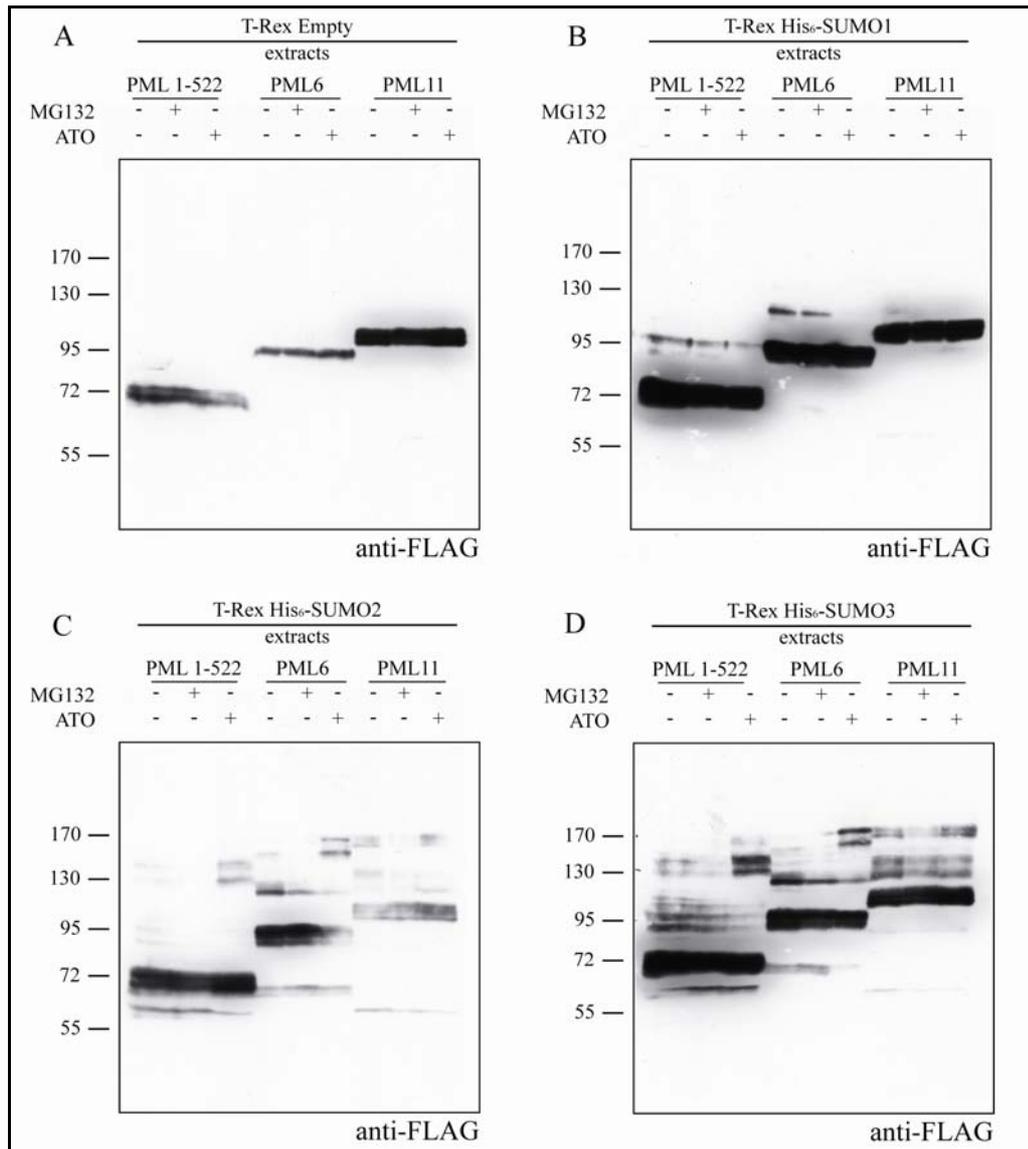


Abb. 3.3.11: Vergleich der Akkumulation von hochmolekularen PML-Konjugaten nach ATO-Behandlung bei PML 1-522, PML6 und PML11: Stabile T-RexTM HeLa B-Zellen (A: Kontroll-; B: SUMO1-; C: SUMO2-; D: SUMO3-Zelllinie) wurden mit FLAG-markierten PML 1-522 *wt*, PML6 und PML11 transfiziert und mit ATO oder MG132 behandelt. Die ungekürzten PML-Isoformen PML6 und PML11 zeigen ein ähnliches Bandenmuster, wie das kürzere PML 1-522-Konstrukt, laufen allerdings entsprechend ihrer Größe höher.

Um zu prüfen, ob diese hochmolekularen SUMO-Konjugate von PML eine Zwischenstufe auf dem Weg zum proteasomalen Abbau darstellen, sollte diese durch Affinitätsreinigungen angereichert und auf die Anwesenheit von Ubiquitin untersucht werden. Aus diesem Grund wurden His₆-SUMO2-Zellen mit dem FLAG-PML 1-522 *wt*- und einem HA-Ubiquitin-Konstrukt transfiziert und wie in vorangegangenen Experimenten mit ATO und/oder MG132 behandelt (Abbildung 3.3.12). Die Affinitätsreinigungen wurden auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt: Die Zelllysate wurden auf unterschiedliche Weise gewonnen, je nachdem wie die sequenziellen Affinitätsreinigungen

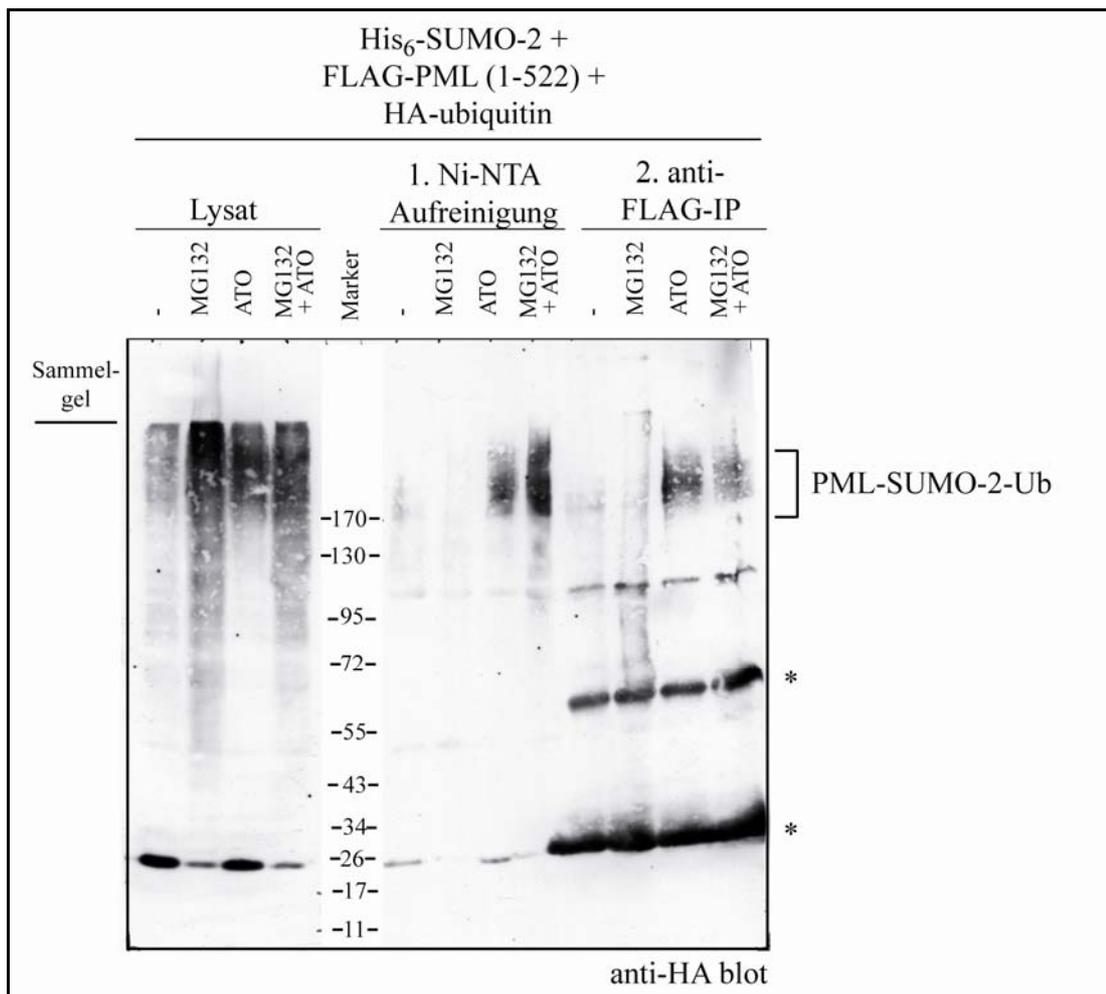


Abb. 3.3.12: Formation von hybriden SUMO-Ubiquitin-Konjugaten auf PML als Antwort auf ATO: In diesem Experimenten wird der Nachweis erbracht, dass PML als Antwort auf ATO-Behandlung sowohl mit SUMO2 als auch mit Ubiquitin modifiziert werden kann. Auf diesem anti-HA Immunblot sind Proben aufgetragen worden, bei denen nach Harnstoff-Aufschluss zuerst eine Ni-NTA und anschließend mit dem Eluat eine FLAG-Affinitätsreinigung durchgeführt wurde. Die eingesetzten SUMO2-Zellen wurden mit FLAG-PML 1-522 *wt* und HA-Ubiquitin transfiziert und wie angegeben mit ATO und/oder MG132 für 6 h behandelt. In den ATO-behandelten Zellen können nach der dem zweiten Reinigungsschritt hochmolekulare PML-SUMO2-Ubiquitin-Konjugate nachgewiesen werden. *: Schwere und leichte IgG Ketten des FLAG-Antikörpers.

vorgenommen werden sollten. Zum einen wurde ein denaturierender Harnstoff (Urea)-Aufschluss für eine Ni-NTA-Reinigung mit anschließender FLAG-Affinitätsreinigung durchgeführt (3.3.12), zum anderen wurden die Zellen, damit sie in umgekehrter Reihenfolge (erst FLAG-IP, dann Ni-NTA-*Pulldown*) sequentiell gereinigt werden konnten, mit TCA aufgeschlossen (3.3.13). In den Eluaten der jeweils ersten Reinigungsschritte (die mittleren vier Spuren der Immunblots, bei denen 25 % des Eluats aufgetragen wurden) ist schon erkennbar, dass die ATO-Behandlung zu einer Anreicherung hochmolekularer HA-Ubiquitin-tragender Konjugate führt. Sowohl die

spezifische Reinigung von His₆-SUMO2-Konjugaten mittels Ni-NTA als auch die Reinigung des FLAG-PML 1-522 *wt* zeigten schon, dass Ubiquitin an SUMO-modifizierten Proteinen oder auch an PML als Antwort der Zellen auf ATO-Behandlung angehängt wurde. Die sequentielle Reinigung dieser Eluate beweist dann das Vorhandensein hochmolekularer (über 170 kDa) PML-SUMO2-Ubiquitin-Hybridkonjugate, die vor allem nach ATO-Behandlung auftreten, wobei in 3.3.12 A auch bei nur mit MG132 behandelten Zellen eine schwache Anreicherung von Hybridkonjugaten zu erkennen ist.

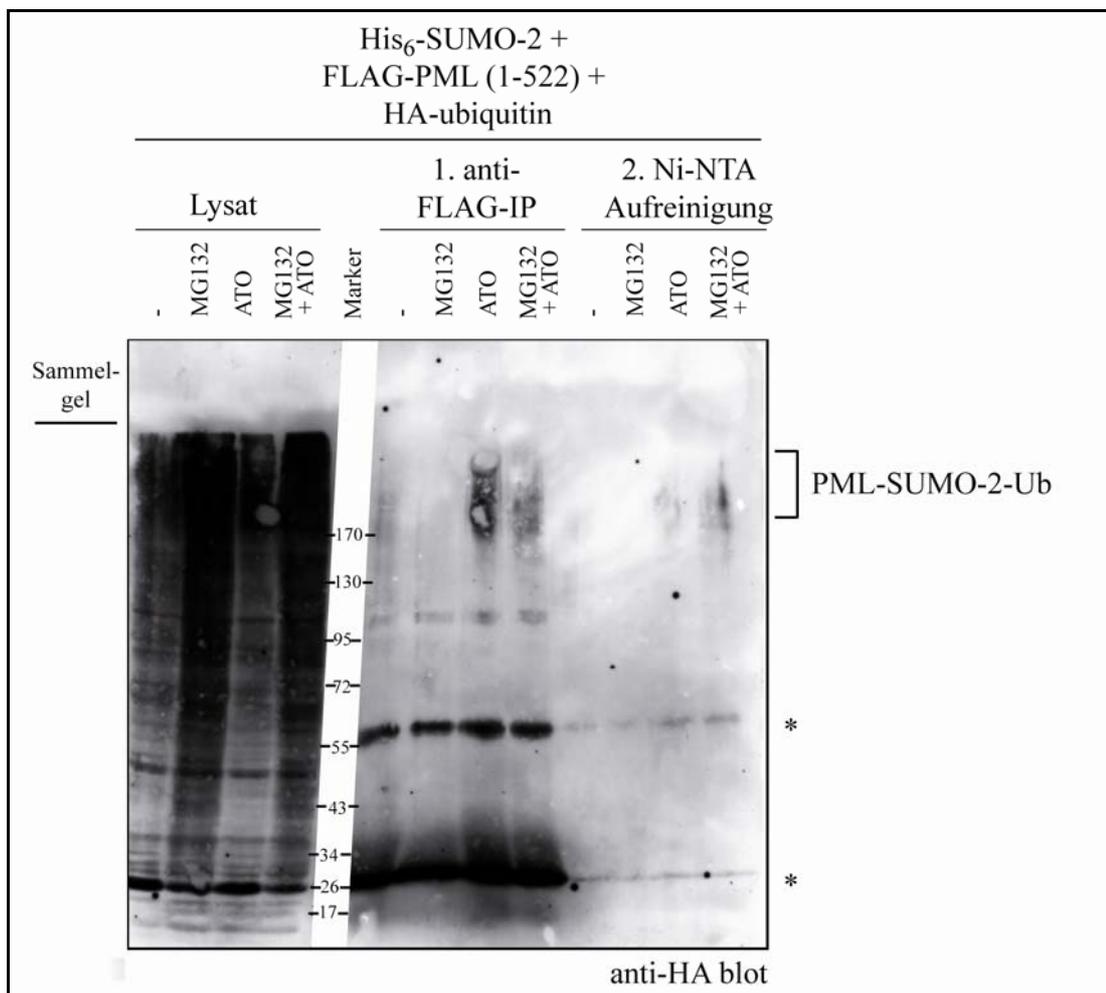


Abb. 3.3.13: Formation von hybriden SUMO-Ubiquitin-Konjugaten auf PML als Antwort auf ATO: In diesem unabhängig von 3.3.12 durchgeführten Experiment wird auch der Nachweis erbracht, dass PML als Antwort auf ATO-Behandlung sowohl mit SUMO2 als auch mit Ubiquitin modifiziert werden kann. Der Western Blot zeigt das gleiche Experiment wie 3.3.12, diesmal wurde aber ein TCA-Aufschluss und sequentielle Affinitätsreinigungen in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Auch hier können in ATO-behandelten Zellen nach der zweiten Reinigung hochmolekulare PML-SUMO2-Ubiquitin-Konjugate nachgewiesen werden. * : Schwere und leichte IgG-Ketten des FLAG-Antikörpers.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, das PML-Protein im Hinblick auf seine posttranslationale Modifikation mit Proteinen der SUMO-Familie zu charakterisieren. Dafür wurden Systeme etabliert, mit denen man *in vitro* und *in vivo* die SUMOylierung des PML-Proteins vornehmen kann, die in den ersten beiden Abschnitten des Ergebnisteils vorgestellt wird. Die Darstellung von SUMOylierten Proteinen ermöglicht deren biochemische Untersuchung. So könnten Bindungsstudien vorgenommen werden und Unterschiede zwischen modifizierten und unmodifizierten Substraten aufgeschlüsselt werden.

Im dritten Abschnitt der Ergebnisse wird gezeigt, dass PML über den neu entdeckten SUMO-abhängigen Ubiquitin/Proteasom-Signalweg abgebaut wird. PML ist damit das erste Substrat aus höheren Eukaryoten, an dem dies nachgewiesen werden konnte. Zusammen mit weiteren Mitarbeitern aus dem Labor von Dr. Praefcke und dem Labor von Prof. Dr. Dohmen konnten wir, aufbauend auf den Daten aus dieser Arbeit, RNF4 als Ubiquitinligase charakterisieren, die PML SUMO-abhängig für den Abbau über das 26S Proteasom markiert (Weisshaar et al., 2008). ATO kann den Abbau von PML über diesen Mechanismus induzieren. Im Zusammenhang mit der klinischen Bedeutung von ATO-Behandlung bei verschiedenen Krebsarten (Ito et al., 2008; Wang and Chen, 2008) kann so der molekulare Mechanismus der Wirkungsweise von ATO auf PML und somit auch auf das PML-RAR α -Fusionsprotein näher charakterisiert werden.

4.1 *In vitro* SUMOylierung

Die *in vitro* Modifikation mit SUMO wurde bereits für verschiedene bekannte SUMO-Substrate rekonstituiert. Manche davon werden bereits sehr effizient modifiziert wenn nur E1 (AOS1/UBA2) und E2 (Ubc9) zugegen sind, als prominentes Beispiel gilt RanGAP1 (Pichler et al., 2002). Andere Substrate benötigen E3-Ligasen für eine effiziente Modifikation (Kagey et al., 2003; Kahyo et al., 2001; Lee et al., 2003; Pichler et al., 2002; Sachdev et al., 2001; Schmidt and Muller, 2002). Bei der *in vitro* SUMOylierung werden die einzelnen Komponenten heterolog exprimiert, z.B. in Bakterien, gereinigt und zusammen in Gegenwart von ATP inkubiert. Die einzelne SUMO-Modifikation eines

Substrats führt in der Regel zu einer Mobilitätsverschiebung, die einer Massenzunahme von 20 kDa entspricht. Diese kann im Coomassie Gel oder im Western Blot-Verfahren oder autoradiographisch sichtbar gemacht werden.

PML hat, wie schon in der Einleitung besprochen, drei SUMOylierungsstellen an den Lysininen 65, 160 und 442 (bzw. 490, je nach Isoform). Die Untersuchungen der Modifikation von PML durch die gereinigten Proteine wurden mit verschiedenen PML-Konstrukten und unterschiedlichen E1- und E2-Chargen unter unterschiedlichen Bedingungen vorgenommen. Als Substrate für die *in vitro* Modifikation mit SUMO1 oder SUMO2 wurden die GST-markierten PML-Konstrukte GST-PML RBI (aa 48-179), GST-PML 1-503, GST-PML 1-522 und GST-PML 1-522 K160R oder RanGAP1 verwendet. Das erste Ziel war zu prüfen, ob die gereinigten Proteinen überhaupt aktiv sind und die Modifikation durchgeführt werden kann. Dies konnte in Abbildung 3.1.2 anhand von RanGAP1 und GST-PML RBI bewiesen werden. Die Enzymkonzentrationen waren jedoch noch viel zu hoch eingestellt, was zu unspezifischer Modifikation der E1- und E2-Enzyme führte. Das Einsetzen verschiedener Chargen an E1- und E2-Enzymen zeigte, dass deren optimale Herstellung und Lagerung kritisch für die Enzymaktivität ist. Bei der Herstellung der Enzyme muss darauf geachtet werden, dass alle Arbeitsschritte zügig aufeinander folgen und die gereinigten Proteine dabei keinesfalls höheren Temperaturen (über 4 °C) ausgesetzt werden dürfen, da sonst die spezifische Aktivität abnimmt.

Die richtige molare Konzentration der Enzyme, aber auch der anderen beteiligten Proteine, ist auch kritisch für das Gelingen der *in vitro* SUMOylierung eines Substrats. Das Einsetzen der enzymatisch aktiven Komponenten im Unterschuss (70 nM E1, 10 nM E2) im Vergleich zu den umzusetzenden Proteinen (Substrat 800 nM, SUMO1 und -2 1 µM, siehe Tabelle 4.1.1) verringert zum einen die auto-Modifikation von E1 und E2 auf dem Western Blot und erleichtert die Detektion der modifizierten Zielproteine.

Unter diesen optimierten Bedingungen konnten auch die längeren PML-Konstrukte nachweislich mit SUMO1 und SUMO2 modifiziert werden (Abbildung 3.1.5 und 3.1.6). Der Vergleich der optimierten Bedingungen für die *in vitro* SUMO-Modifikation von PML dieser Arbeit, mit den Bedingungen anderer Arbeitsgruppen zeigt, dass PML schon bei Anwesenheit von relativ wenig SUMO modifiziert wird (230 ng im Vergleich zu 1,5 µg, bzw. 4 µg) (Gostissa et al., 1999; Pichler et al., 2002). Tabelle 4.1.1 fasst die verschiedenen Bedingungen zusammen. In frühen *in vitro* SUMOylierungen wurden humane Zellextrakte verwendet, um E1-Aktivitäten zu gewinnen, da die Reinigung von AOS1 und UBA2 noch nicht etabliert war (Gostissa et al., 1999). Mehrere Autoren

verwendeten diesen Ansatz, um SUMOylierung ihrer jeweiligen Substrate nachzuweisen (u.a. (Collavin et al., 2004; Colombo et al., 2002; Long et al., 2004)). RanGAP1 war das erste Substrat an dem gezeigt wurde, dass es *in vitro* SUMOyliert wird und dass daran die E1 Proteine AOS1 und UBA2 beteiligt sein müssen (Okuma et al., 1999). Unter optimierten Bedingungen (siehe Tabelle 4.1.1) konnte Andrea Pichler aus der Arbeitsgruppe von Prof. Frauke Melchior später RanGAP1 *in vitro* SUMOylieren. RanGAP1 wurde nach 30 Minuten zu etwa 90 % mit SUMO1 modifiziert und dies konnte sogar auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel nachgewiesen werden (Pichler et al., 2002).

Protein	Vorliegende Arbeit	Pichler <i>et al.</i> 2002	Gostissa <i>et al.</i> 1999 ³
SUMO1 oder -2	1 µM (230 ng)	6,5 µM (1,5 µg)	4 µg
E1	70 nM (150 ng)	70 nM (150 ng)	10 µg Zellextrakt
E2	10 nM (22 ng)	5 nM (10 ng)	100-300 ng
Substrat	800 nM (1,32 µg) ¹	~ 400 nM (500 ng) ²	1 µg p53
ATP	1 mM	5 mM	2 mM

Tab. 4.1.1: Bedingungen für die *in vitro* SUMOylierung in verschiedenen Arbeiten: Gegenübergestellt sind drei *in vitro* SUMOylierungsbedingungen. ¹: GST-PML 1-522; ²: RanGAP1; ³: keine Volumenangaben für die Reaktion, nur Mengenangaben in µg und ng. (Gostissa et al., 1999; Pichler et al., 2002)

Ein großes technisches Problem bei der *in vitro* SUMOylierung in dieser Arbeit war die Detektion der GST-PML-Konstrukte mit Hilfe des GST-Antikörpers. Abb. 3.1.7 B zeigt ein Beispiel eines anti-GST-Immunblots. Hier wurden sehr viele Banden unterhalb des eigentlichen GST-Konstruktes detektiert so dass fast nur ein Schmier bis zur Höhe der 100 kDa-Bande zu erkennen war. Betrachtet man die gereinigten GST-PML-Konstrukte aus Abbildung 3.1.2, so sind auch Proteine unterhalb der gereinigten Zielproteine zu erkennen, aber bei weitem weniger, als es der Western Blot vermuten ließe. Durch den sehr sensiblen GST-Antikörper werden im Western Blot diese schon im SDS-Gel sichtbaren Banden stark und auch weitere dort nicht zu identifizierende Banden überproportional nachgewiesen. Zum einen ist dies ein Hinweis darauf, dass es sich bei den Verunreinigungen im SDS-Gel wohl hauptsächlich um verkürzte GST-Konstrukte handelt, die in den *E.coli* Bakterien vermutlich durch Abbau bzw. der nicht vollständig ausgeführten Translation entstanden sein könnten. Zum anderen zeigt dieser Western Blot in 3.1.7 B die große Problematik, dass mit dem GST-Antikörper in den meisten durchgeführten Untersuchungen der SUMOylierung häufig kein analysierbares Ergebnis

gewonnen werden konnte, da die Immunblots stark überbelichtet wurden. Das ist der Grund, warum für die in Abschnitt 3.1 gezeigten Versuche zumeist keine dazugehörigen anti-GST Western Blots geliefert werden konnten, sondern der Nachweis der SUMO-Modifikation über Immunblots mit SUMO1- und SUMO2/3-Antikörper erfolgte. Der Nachweis von PML mit einem spezifischen PML-Antikörper gelang im Western Blot nicht, obwohl zahlreiche Antiseren getestet wurden. Die Problematik mit dem GST-Antikörper ließe sich durch verschiedene Herangehensweisen lösen. Zum ersten könnte für die GST-Detektion nur ein Bruchteil von dem auf ein SDS-Gel für einen Immunblot aufgetragen werden was für einen SUMO1 oder SUMO2-Immunblot benötigt würde. Des Weiteren könnte man die gesamte Detektion mit dem GST-Antikörper optimieren (weniger primären, weniger sekundären Antikörper einsetzen).

In den frühen Veröffentlichungen die sich mit *in vitro* SUMOylierten Substraten beschäftigten, wurde der Nachweis zumeist radioaktiv mit ^{35}S -markierten *in vitro* translatierten Proteinen erstellt (Collavin et al., 2004; Gostissa et al., 1999). Die Ausbeute an SUMO-modifiziertem Substrat (p53 und GATA1) war dabei immer sehr gering und lag etwa bei 1-5 % des eingesetzten Substrats. HDAC1 und Smad4 konnten mit Hilfe des Gostissa-SUMOylierungssystems (siehe Tabelle 4.1.1) zu etwa 20 % *in vitro* mit SUMO modifiziert werden, was per Western Blot nachgewiesen wurde (Colombo et al., 2002; Long et al., 2004). Da in der vorliegenden Arbeit überwiegend der Nachweis der SUMO-Modifizierung durch SUMO-Antikörper erbracht wurde, kann der prozentuale Anteil des umgesetzten PMLs nicht genau angegeben werden. In Coomassie-gefärbten SDS-Gelen war der Anstieg der SUMO-Modifikation nicht nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Aus der Abbildung 3.1.7 B kann jedoch geschlossen werden, dass nur ein geringer prozentualer Anteil an GST-PML mit SUMO1 modifiziert wurde, höchstens 1-5 %. Eine höhere Umsatzrate der Modifikation von PML mit SUMO2 lässt sich in Abbildung 3.1.6 vermuten, kann aber wegen des fehlenden GST-Blots nicht bestätigt werden. Die starken SUMO2-Bandenmuster wurden in den Spuren nachgewiesen, in denen das E2-Enzym des SUMOylierungsbaukasten zugegeben wurde. Die Enzyme des Baukastens waren immer mindestens so aktiv wie die selbst gereinigten Proteine, zum Teil waren sie sogar aktiver. Das kann zum einen an optimierten Reinigungsbedingungen des Herstellers liegen und zum anderen auch an den Puffern in denen die Enzyme gelagert werden. Die erfolgreiche SUMO2-Modifikation von PML in Abbildung 3.1.6 Spur 2, bei der einzig das E2-Enzym des Baukastens verwendet wurde, spricht aber dafür, dass auch der selbst

zusammengestellte Puffer (Transportpuffer, der von Pichler *et al* übernommen wurde (Pichler et al., 2002)) die richtige Rahmenbedingung für die SUMO-Modifizierung gibt.

Aufgrund der Schwierigkeiten die Substrate direkt im Western Blot nachzuweisen, kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob SUMO2 besser an PML als Substrat gebunden werden kann als SUMO1 oder andersherum. Es ist nur festzustellen, dass beide Isoformen an PML gebunden werden können und SUMO1 augenscheinlich im direkten Vergleich etwas besser konjugiert wird (siehe Abb. 3.1.5). Dabei muss aber beachtet werden, dass die Sensitivität der SUMO-Antikörper unterschiedlich sind. Nur der Nachweis des Substrates selbst durch den GST-Antikörper oder durch spezifische PML-Antikörper könnte eindeutige Vergleiche zwischen der Konjugation der beiden SUMO-Isoformen aufdecken.

Das Konstrukt GST-PML 1-522 wird im Vergleich zu der verkürzten Form PML 1-503 ohne SIM oder der K160R-Mutante stärker SUMOyliert (Abbildung 3.1.7 A). Der Immunblot in 3.1.7 B zeigt aber, dass dies auch an der größeren Menge an GST-PML 1-522 liegen könnte, die im Vergleich zu den anderen Konstrukten als Substrat zur Verfügung gestanden hat. Deshalb kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob das SIM einen Einfluss auf die SUMO-Modifikation von PML hat.

Für PML wurde bisher noch keine spezifische SUMO E3-Ligase gefunden. In der Arbeitsgruppe von Mary Dasso konnte aber gezeigt werden, dass PML seine eigene Modifikation mit humanem SUMO1 in Hefe stimulieren kann und zwar in Abhängigkeit des RING Fingers von PML (Quimby et al., 2006). Daher wurde für PML selbst eine Funktion als SUMO E3-Ligase postuliert. Mit Hilfe des *in vitro* SUMOylierungssystems könnte diese Funktion überprüft werden. Mehrere Szenarien wären dafür denkbar. Erstens kann PML über seine RING Domäne mit Ubc9 interagieren (Duprez et al., 1999). Zweitens wäre es vorstellbar, dass das SIM von PML Ubc9 rekrutiert, entweder über das beladene SUMO oder über die auto-SUMOylierung an Lysin 14 (Knipscheer et al., 2008). Als E3 könnte PML in beiden Fällen (Bindung des E2 an RING oder an SIM) mit der jeweils noch freien Domäne mit Zielproteinen interagieren (über die RING Domäne z.B. auch an PML selbst, über das SIM mit anderen schon SUMO-modifizierten Substraten, wobei PML hierbei auch vorstellbar wäre) und eine SUMO-Modifikation in *trans* koordinieren. Durch die Bindung des E2 an das SIM wäre aber auch eine Auto-SUMOylierung von PML denkbar. Das SIM könnte auch eine Konformationsänderung von PML koordinieren indem es mit einem SUMO auf dem PML selbst interagiert. *In vitro* SUMOylierungsexperimente könnten diese Möglichkeiten aufschlüsseln und eine etwaige

E3 Funktion näher charakterisieren. Dabei würden PML-Konstrukte mit Mutationen oder Deletionen in der RING Domäne oder dem SIM eingesetzt und die Fähigkeit Substrate zu SUMOylieren getestet werden.

Um zu prüfen, ob eine solche E3-Aktivität *in trans*, d. h. zwischen zwei PML Molekülen stattfindet, könnten Experimente durchgeführt werden, bei denen z.B. das PML 1-503 Konstrukt als Substrat in hoher Konzentration (800 nM) und zusätzlich PML 1-522 in enzymatischer Menge (20 nM) als potentiell E3 eingesetzt wird. Wäre hier eine Steigerung der SUMO-Modifikation nachweisbar, könnte dies einen weiteren Hinweis auf eine Funktion PMLs als eigene SUMO-E3-Ligase geben, wobei unter Umständen die SUMOylierung des PMLs mit SIM (PML 1-522) selbst einen Einfluss auf eine eventuelle Reaktivität als E3 Enzym haben könnte. Es ist schwierig zu prognostizieren, wie PML *in vivo* SUMOyliert ist, da es drei SUMOylierungsstellen besitzt und diese unterschiedlich modifiziert vorkommen könnten. Zum Beispiel könnte es sein, dass unterschiedliche SUMO-Isoformen an den SUMOylierungsstellen verknüpft werden und dies einen Einfluss auf die Funktion des PMLs ausüben, je nachdem welche Isoform wo verknüpft wurde. Dies könnte durch den Einsatz von PML-Punktmutanten getestet werden.

Es können weitere Substrate für die SUMO-Modifikation untersucht werden. Durch einsetzen verschiedener Kandidaten die eine SUMO-E3-Funktion besitzen, bzw. besitzen könnten, kann *in vitro* untersucht werden, welche Substrate SUMOyliert werden und ob ein E3 Enzym diesen Vorgang erleichtert. Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung hat gezeigt, dass das SUMO-E2 Ubc9 durch Auto-SUMOylierung am Lysin 14 seine Spezifität zu für verschiedenen Substraten verändert (bei Sp100 steigert, bei RanGAP1 blockiert) (Knipscheer et al., 2008). Mit Hilfe der *in vitro* SUMOylierung, bei der man E2 als Substrat einsetzt, könnten über Reinigungsschritte SUMO-modifiziertes E2 isoliert werden, dass dann wiederum innerhalb einer *in vitro* Untersuchung eingesetzt werden könnte, damit weitere Erkenntnisse über SUMO-abhängige Prozesse gewonnen werden können.

Zusammengefasst wurde in diesem Teil der Arbeit ein SUMOylierungssystem etabliert, das ein Werkzeug für die biochemische Untersuchung von Substraten, in unserem Fall für PML, bereitstellt. Dieses System kann noch verbessert werden, vor allem muss die Problematik des direkten Nachweises des Substrats gelöst werden. Die *in vitro* SUMOylierung eignet sich besonders gut dafür viele verschiedene Substrate parallel zu testen. Für die Gewinnung größerer Mengen an SUMOylierten Proteinen erscheint es jedoch nicht geeignet zu sein.

4.2 *In vivo* SUMO-Modifikation von Substraten in bakteriellen Expressionssystemen

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, ein *in vivo* SUMOylierungssystem mit Hilfe eines trimeren Vektorsystems zu etablieren. Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass man neben den für die SUMOylierung notwendigen Proteinen SUMO, E1 (AOS1 und UBA2), E2 (mUbc9) ein Substrat und zusätzlich noch ein etwaiges E3 Enzym gleichzeitig innerhalb eines *E. coli* Expressionstammes exprimieren kann und somit SUMO-modifizierte Substrate einfach reinigen kann. Die Abbildung 3.2.1 zeigt klar, dass es möglich ist ein SUMO-modifiziertes PML-Konstrukt (in diesem Fall GST-PML RBI aa 48-179) zu reinigen. Bei dieser einfachen GSH-Reinigung wurde das Substrat GST-PML RBI sowohl in unmodifizierter als auch in verschiedenen mit SUMO1-modifizierter Form angereichert. In einer kürzlich erschienenen Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass einfach SUMO-modifiziertes PML ein unterschiedliches Laufverhalten in SDS-Gelen offenbart, je nachdem an welcher der drei SUMOylierungsstellen das SUMO gekoppelt ist (Lallemand-Breitenbach et al., 2008). Deshalb stellen die prägnanten Banden im anti-SUMO1 Western Blot in der Eluat-Spur vermutlich zwei unterschiedlich einfach SUMOylierte und das zweifach SUMOylierte PML-RBI dar. Da die mittlere Bande die stärkste ist, könnte es sein, dass die Modifikation an einer der beiden SUMOylierungsstellen des PML RBI-Konstrukts (K65 oder K160) favorisiert wird. Mit Mutanten in den SUMOylierungsstellen (K65R oder K160R) oder einer massenspektroskopischen Untersuchung der Banden könnte sowohl das Laufverhalten als auch die Bevorzugung einer SUMOylierungsstelle eingehender studiert werden.

Der anti-GST Western Blot des SUMOylierten Substrats im Eluat zeigt, dass etwa ein Viertel des PML RBI, verteilt auf drei Banden, modifiziert wurde. Dies erscheint sehr viel mehr als es bei der *in vitro* SUMOylierung der Fall war. Interessanterweise sind beim Vergleich des Rohlysates mit dem Eluat die SUMOylierten Formen im Eluat angereichert worden. Im Rohlysat waren mit dem GST-Antikörper noch keine der drei hochmolekularen Banden mit modifiziertem PML RBI detektierbar. Da über eine GSH-Matrix gereinigt wurde, wäre es eigentlich folgerichtig, dass die GST-markierten Proteine in gleichem Verhältnis angereichert werden, wie sie im Rohlysat vorlagen. Nun erkennt man aber, dass unmodifiziertes PML RBI noch im Durchfluss nachweisbar ist. Das ist ein Indiz dafür, dass die GSH-Matrix mit GST-markiertem Protein gesättigt war. Dass nun die SUMOylierten Formen besser an die GSH-Matrix binden ist unwahrscheinlich, eher lässt

sich vermuten, dass sie durch die SUMO-Modifikation besser mit sich selbst und den unmodifizierten GST-PML RBI interagieren können. Deshalb könnten die modifizierten Formen angereichert worden sein, da sie nicht nur direkt über die GSH-Matrix sondern auch an daran gebundenes PML RBI gereinigt wurden.

Dieses *in vivo* System ist für die Gewinnung von präparativen Mengen rekombinanter SUMOylierter Proteine geeignet. Durch die technisch einfache Möglichkeit einer sequentiellen Reinigung, erst GSH und dann eine Ni-NTA-Reinigung, kann das SUMO-modifizierte Protein vom unmodifiziertem getrennt werden, da SUMO mit einem N-terminalen His markiert ist. So können bei schlechten SUMO-Substraten, die nur zu geringen prozentualen Anteilen im *E.coli*-System modifiziert werden, durch große Ansätze reine modifizierte Substrate angereichert werden.

Als Limitierung des Systems könnten zu große und/oder unlösliche Substrate und E3-Ligasen Probleme bereiten, da sie nicht gereinigt werden können. Auch könnten speziell SUMO-modifizierte Proteine unlösliche Aggregate ausbilden, so dass in diesem Fall nur unmodifiziertes Protein gereinigt werden könnte. Kann das Substrat aber in *E.coli* problemlos exprimiert, modifiziert und anschließend gereinigt werden, so hat dieses System den besonderen Vorteil schnell, preiswert und unkompliziert an Ausgangsmaterial für viele weitere biochemische Untersuchungen zu gelangen.

In der Literatur wurde bisher ein Expressionssystem beschrieben, bei dem die SUMOylierungsmaschinerie in nur einen Vektor kloniert wurde und nur das Substrat auf einem zweiten Vektor vorlag (Uchimura et al., 2004). Dabei wurden die E1-Enzyme als linearisiertes Fusionsprotein eingebracht, das zusammen mit E2 und SUMO1 oder SUMO2 auf einem Vektor zusammengefasst wurde. Der Vorteil des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Systems liegt darin, dass jedes Protein der Maschinerie einzeln exprimiert wird und dadurch die enzymatische Aktivität gerade des E1 Heterodimers erhöht wird. Außerdem besteht die Möglichkeit ohne großen Aufwand ein sechstes Protein, z. B. eine putative SUMO-E3-Ligasen mit einzuführen (auf den Vektor zusammen mit dem Substrat), welches die SUMO-Modifikation noch verstärken könnte. Zudem können etwaige E3-Ligasen einfach und schnell für ein gegebenes Substrat getestet werden. Der einzige Nachteil besteht in der gleichzeitigen Verwendung von drei Antibiotika, was sich negativ auf das Wachstum der *E.coli* Zellen auswirkt (Daten nicht gezeigt). Daher bildet dieses einfach zu benutzende *in vivo* SUMOylierungssystem Vorteile gegenüber der *in vitro* SUMOylierung mit einzeln gereinigten Komponenten, da die Produktion einer beliebigen Menge an SUMOyliertem Substrat ermöglicht wird. Zudem können flexibel

Komponenten wie E3 und Substrate eingesetzt werden, so dass eine große Auswahl an biochemischen Untersuchungen vorgenommen werden können.

Als Beispiel kann so gereinigtes Substrat in der Folge in weiteren Untersuchungen eingesetzt werden. Zum Beispiel kann SUMO-modifiziertes GST-PML an GSH-Sepharose gekoppelt und zur Reinigung von Zelllysaten verwendet werden. Damit können spezifischer Interaktionspartner von SUMOyliertem PML aufgefunden gemacht werden die nicht an unSUMOyliertes PML oder freies SUMO binden, die als Kontrolle in einem zweiten Ansatz zur Reinigung von Zelllysaten eingesetzt würden.

Eine andere Möglichkeit SUMOyliertes PML für Experimente zu verwenden wurde von Kirstin Keusekotten in unserem Labor durchgeführt. Mit Hilfe des *in vivo* SUMOylierungssystems reinigte sie SUMO1 und SUMO3 modifiziertes PML RBI (aa 50-

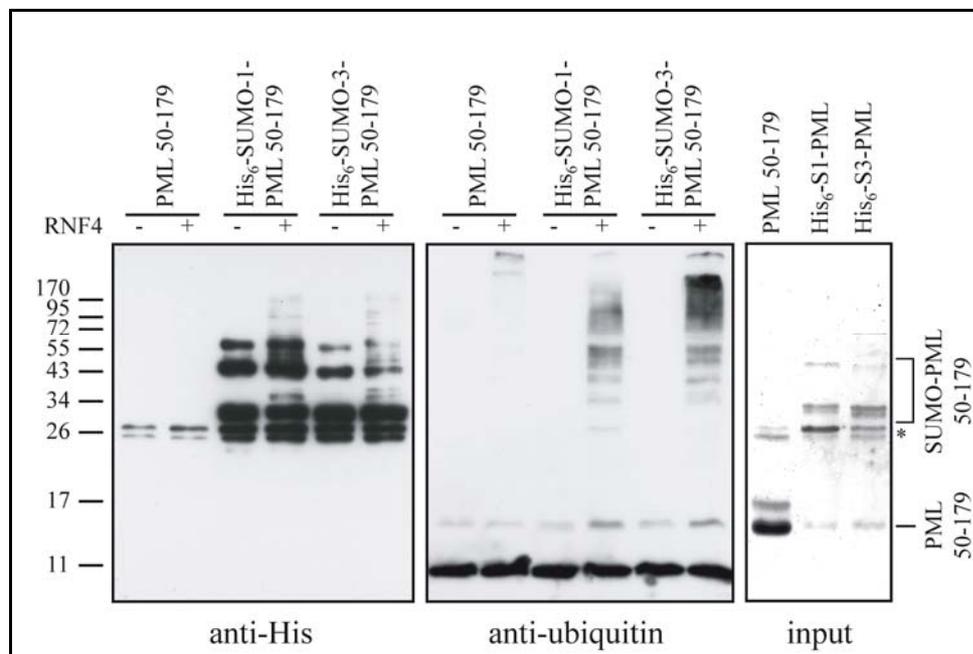


Abb. 4.2.1: RNF4-abhängige Ubiquitinierung von SUMO-modifiziertem PML *in vitro*: Unmodifiziertes, His₆-SUMO1 und His₆-SUMO3 modifiziertes PML RBI wurden in *E.coli* exprimiert und chromatographisch gereinigt (rechtes Feld). Die RNF4 abhängige Ubiquitinierung wurde mittels anti-His (linkes Feld) und anti-Ubiquitin (mittleres Feld) Immunblots analysiert. * markiert verbliebene His-Markierte TEV-Protease. Die Experimente wurden von Kirstin Keusekotten durchgeführt. Entnommen aus (Weisshaar et al., 2008).

179). Nachdem sie die GST-Markierung mit Hilfe der TEV-Protease abschnitt, wurde das so erhaltene isolierte PML RBI-SUMO1 und PML RBI-SUMO3 im Vergleich zu unmodifiziertem PML RBI in einen *in vitro* Ubiquitinierungsversuch eingesetzt. Kirstin Keusekotten gelang mit diesem System der Nachweis, dass das ULS RNF4 (*RING finger protein 4*) spezifisch an SUMO-Modifiziertem PML RBI *in vitro* Ubiquitin anhängt, wobei das SUMO3 modifizierte PML RBI am stärksten und das unmodifizierte PML RBI so gut wie nicht Ubiquitiniert wurde (Abbildung 4.2.1) (Weisshaar et al., 2008).

4.3 SUMO abhängiger Abbau von PML über das 26S Proteasom

Kristina Uzunova aus dem Labor von Prof. Dr. Jürgen Dohmen konnte in der Bäckerhefe eine Verbindung zwischen SUMO-Modifikation verschiedener Proteine und dem dadurch folgenden Abbau durch das Ubiquitin/Proteasom-System herstellen. Zuvor wurde in der Fachwelt davon ausgegangen, dass SUMOylierung und Ubiquitinierung zwei unabhängige und eher antagonistisch arbeitende Systeme sind. SUMO-Modifikation wurde als Modulation der Funktion eines jeweiligen Substrates angesehen, die Interaktion mit anderen Proteinen steuert und/oder deren Lokalisation beeinflusst (Desterro et al., 1998; Johnson, 2004; Melchior et al., 2003). Kristina Uzunova und Kollegen entdeckten in der Hefe *S.cerevisiae* RING-Finger-Proteine die SUMO Interaktionsmotive (SIM) tragen: Ris1 und das Hex3-Slx8 (*synthetic lethal of unknown [x] function*)-Heterodimer. Sie konnten nachweisen, dass dies ULS-Proteine sind, die benötigt werden um SUMO-Konjugate in der Hefe zu ubiquitinieren (Uzunova et al., 2007).

4.3.1 Auswirkungen der Proteasominhibition auf SUMO-Konjugate in humanen Zellen

Mit den Experimenten zur Proteasominhibition in humanen HeLa B-Zellen sollte die Konservierung der Ubiquitinierung von SUMO-Konjugaten zwischen Hefe und dem Menschen gezeigt werden. Die Abbildung 3.3.1 zeigt deutlich, dass sich in den Zellen durch die Proteasominhibition SUMO2/3-modifizierte hochmolekulare Konjugate anreichern. Folglich ist die proteolytische Kontrolle von SUMO-Konjugaten auch in humanen Zellen nachweisbar. SUMO1-Konjugate sind dabei sehr viel weniger betroffen, was mit den Unterschieden zwischen den humanen SUMO-Isoformen erklärt werden kann. SUMO1 fehlt im N-terminalen Bereich ein SUMOylierungsmotiv und ist deshalb nicht in der Lage wie SUMO2/3 effizient Ketten auszubilden (Tatham et al., 2001). Betrachtet man zusätzlich das Verhalten der SUMO-Isoformen auf die Antwort von zellulären Stressen (Abbildung 3.3.2), erkennt man eine stärkere Anreicherung von SUMO2/3-Konjugaten im Gegensatz zu den SUMO1-Konjugaten. Dieser Umstand könnte damit erklärt werden, dass das SUMO1 schon zum größten Teil an Substrate konjugiert vorliegt und nicht wie das freie SUMO2/3 für eine Konjugation zur Verfügung steht. Eine andere Situation ergibt sich in den analog durchgeführten Experimente mit den stabilen T-RexTM HeLa-Zelllinien

(3.3.6), bei denen durch die Überexpression von His₆-SUMO1 auch große Mengen an freiem SUMO1 vorliegen. Hier werden durch Proteasominhibition zwar auch SUMO1-Konjugate angereichert, aber in den His₆-SUMO2- und den His₆-SUMO3-Zellen ist die Anreicherung noch stärker. His₆-SUMO1 könnte aber als Abschluss an endogene SUMO2/3-Ketten gekoppelt werden, was die Akkumulation in den stabilen SUMO1-Zellen erklären würde. Die Proteasominhibition führt also primär zur Anreicherung von hochmolekularen Konjugaten, die mit SUMO-Ketten modifiziert sind.

Unter Stressbedingungen, hervorgerufen durch NaCl, Ethanol, H₂O₂ oder ATO (Abbildung 3.3.2), bilden sich vermehrt hochmolekulare SUMO2/3-Konjugate. Im selben Experiment kommt es nicht zu einer Anreicherung von SUMO1-Konjugaten. In der Literatur gibt es aber Hinweise darauf, dass Stress auch spezifisch die SUMO1-Konjugation bestimmter Proteine induziert.

Das bedeutet, dass unter Stressbedingungen entweder die Konjugation mit SUMO2/3 induziert wird, die Dekonjugation durch SENPs blockiert oder die SUMO2/3-Konjugate wegen Überlastung des Ubiquitin/Proteasom-Systems (UPS) nicht mehr schnell genug abgebaut werden können. Wahrscheinlich kann die Anhäufung von SUMO2/3-Konjugaten aber aus einer Verbindung dieser drei Möglichkeiten hervorgehen.

ULS-Proteine vermitteln die Ubiquitinierung von SUMO-modifizierten Substraten

Wie die Experimente von Kristina Uzunova und Kollegen zeigen, steuern SIM-tragende ULS-Proteine die Ubiquitinierung von SUMO-Konjugaten. Dies wurde in verschiedenen Experimenten fast zeitgleich auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Die Mitarbeiter des Labors von Prof. Dr. Hochstrasser konnten mit *in vitro* Experimenten ein Modellsubstrat, ein von einem Vektor exprimiertes RAD52-SUMO-Fusionsprotein, durch das Hex3-Slx8-Heterodimer ubiquitinieren (Xie et al., 2007). Unabhängig davon konnte auch in der Arbeitsgruppe Dohmen mit einem *in vitro* Experiment durch eine Auto-Ubiquitinierungsreaktion nachgewiesen werden, dass in *E. coli* exprimiertes Hex3-Slx8-Heterodimer eine Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität besitzt (Uzunova et al., 2007).

Weitere Arbeitsgruppen konnten in der Spaltheife *S. pombe* nachweisen, dass ein Komplex aus Slx8 mit entweder Rfp1 oder Rfp2 (*RING finger protein*) auch als ULS, analog zu Hex3-Slx8 in *S. cerevisiae*, arbeitet (Prudden et al., 2007; Sun et al., 2007). Dabei zeigen die Proteine Rfp1 und Rfp2 eine schwache Sequenzhomologie zum humanen RNF4, und Versuche in *S. pombe* mit Rfp1 und Rfp2 Mutanten zeigten, dass dieses humane ULS-Homolog den Phänotyp komplementieren kann (Kosoy et al., 2007; Prudden

et al., 2007). Da RNF4 *in vitro* SUMOyliert werden kann und außerdem eine Auto-Ubiquitinierungsaktivität besitzt (Hakli et al., 2005; Hakli et al., 2004), legen diese Erkenntnisse nahe, dass RNF4 ein ULS-Protein sein könnte. Sun und Kollegen zeigten, dass RNF4 *in vitro* in der Lage ist Ubiquitin an GST-SUMO-1 und -2 zu koppeln (Sun et al., 2007). Zusammengefasst sind dies Indizes dafür, dass in humanen Zellen die SUMO-abhängige Ubiquitinierung mittels ULS-Proteinen mit anschließendem Abbau über das 26S Proteasom konserviert ist.

Im Menschen können verschiedene Proteine identifiziert werden, die die Voraussetzung für ein ULS erfüllen. SIMs und RING-Domänen besitzen neben RNF4 unter anderem auch PML, ARD1 (*ADP-ribosylation factor domain protein 1*) und TIF1 α (*Transcriptional intermediary factor 1*), wobei für ARD1 bereits Ubiquitinierungsaktivität nachgewiesen werden konnte (Vichi et al., 2005). Vergleichbar mit den Ergebnissen, dass RNF4 in *S. pombe* den Verlust von Rfp1 oder Rfp2 ausgleichen kann, konnte im Labor von Prof. Dr. Dohmen gezeigt werden, dass RNF4 auch den Ausfall von Hex3 oder Slx8 in *S. cerevisiae* kompensieren kann (Uzunova et al., 2007). PML wurde in diesen Untersuchungen auch getestet, konnte aber den Phänotyp der Hex3 oder Slx8 Deletion nicht umkehren.

Mehrere Erkenntnisse untermauern demnach die Annahme, dass die SUMO- und Ubiquitin-abhängige Kontrolle des Abbaus verschiedener Proteine von der Hefe bis zum Menschen konserviert vorzufinden ist. Erstens führt die Proteasominhibition in humanen Zellen zum Anstieg der endogenen SUMO2/3-Konjugate. Zweitens konnte der Nachweis erbracht werden, dass das humane Protein RNF4 in Hefe und *in vitro* als ULS fungieren kann und drittens demonstriert das Experiment in Abbildung 3.3.4, das Vorhandensein gemischter SUMO/Ubiquitin-Konjugate in humanen Zellen.

Sind SUMO-Ketten für die Markierung zur proteasomalen Degradation notwendig?

Da im Menschen SUMO2/3 und in der Hefe Smt3 jeweils die Fähigkeiten besitzen SUMO-Ketten auszubilden, könnte dies der entscheidende Unterschied sein, warum die endogenen SUMO1-Konjugate sich nicht nach Proteasominhibition deutlich anreichern. Da die bisher untersuchten ULS-Proteine im Allgemeinen mehrere SIMs tragen, könnte geschlossen werden, dass sie bevorzugt an SUMO-Ketten binden können. Andererseits können Proteine auch an mehreren verschiedenen Stellen Mono-SUMOyliert werden und somit auch bevorzugte Interaktionspartner für ULS-Proteine werden. Die Versuche mit transient transfizierten FLAG-markierten SUMO-Isoformen (Abbildung 3.3.2) zeigen, dass

sich bei überexprimierten FLAG-SUMO1 kaum hochmolekulare Konjugate nach Proteasominhibition anhäufen. Im Unterschied dazu reichern sich Konjugate nach MG132 Behandlung bei FLAG-SUMO3 und bei FLAG-SUMO3 K11R an. Die FLAG-SUMO3 K11R Mutante, bei der die Konsensusstelle für die SUMOylierung inaktiviert wurde, sollte theoretisch keine Ketten mehr ausbilden. Uzunova und Kollegen untersuchten in der Bäckerhefe ob die Inhibition der SUMO-Kettenbildung einen Einfluss auf die Bildung von hochmolekularen SUMO-Ubiquitin-Hybrid-Konjugaten hat (Uzunova et al., 2007). Hefestämme, die Ulp2 defizient sind, zeigen einen Anstieg dieser Hybridkonjugate. Ulp2 ist die SUMO-spezifische Protease in Hefe, die bevorzugt die Dekonjugation von Smt3-Ketten durchführt (Bylebyl et al., 2003). Das mutierte Smt3-R11,15,19, das keine Ketten mehr ausbilden kann, zeigt dagegen keine Anreicherung von Hybridkonjugaten aus SUMO und Ubiquitin in den Ulp2 defizienten Stämmen (Uzunova et al., 2007). Daher kann daraus geschlossen werden, dass zumindest in der Bäckerhefe vor allem SUMO-Ketten modifizierte Substrate durch ULS-Proteine erkannt und ubiquitiniert werden. Das Ergebnis in Abbildung 3.3.2 mit der Akkumulation von humanen SUMO3 K11R-Konjugaten scheint diesen in der Hefe gewonnenen Erkenntnissen zu widersprechen. Jedoch muss aber folgendes beachtet werden: Zum einen könnte es sein, dass durch das endogene SUMO2/3, das ja nach wie vor vorhanden ist, in den SUMO3 K11R-transfizierten Zellen weiter Ketten gebildet werden können und die mutierte Form immer nur den Abschluss einer Kette bildet. Zum anderen trägt das SUMO3 K11R in seinem N-terminalen Bereich noch weitere Lysine (z.B. K5, K7 und K21), die die Rolle des mutierten Lysins 11 als SUMOylierungsstelle einnehmen könnten. Um letzteres zu prüfen könnte eine SUMO3 Mutante generiert und eingesetzt werden, der alle diese Lysine durch Arginine ausgetauscht würden.

Die Frage, ob Ketten an Substraten von Nöten sind damit die Proteine von ULS-Proteinen für den Abbau markiert werden können, kann mit den bisherigen Experimenten nicht geklärt werden. Eine Alternative könnte sein, dass tatsächlich auch eine Multi-SUMOylierung an verschiedenen Stellen der Substrate ausreicht, damit ULS-Proteine die Ubiquitinierung vornehmen können.

Eine Studie konnte zeigen, dass die Überexpression von SUMO2 dazu führt, dass das Amyloid β -Peptid (A β) zum Großteil verschwindet. Die Überexpression der Mutante SUMO2 K11R führt jedoch zu einem Anstieg der A β Menge (Li et al., 2003). Zwar konnten in dieser Studie keine SUMO-modifizierte Formen des Amyloid-Vorläufer-Proteins gezeigt werden, aber die Modifikation mit SUMO1 wurde in einer späteren

Veröffentlichungen nachgewiesen (Gocke et al., 2005). Im Lichte der hier gezeigten Ergebnisse könnte eine Verbindung zu der Regulation von A β durch SUMO2/3-Ketten erstellt werden, die durch die Kontrolle der Stabilität des Amyloid-Präkursor-Proteins vermittelt wird. Interessanter Weise kann auch die Proteasominhibition die Menge an A β erhöhen (Flood et al., 2005; Uzunova et al., 2007).

In einer anderen kürzlich erschienen Studie führt Hypoxie zu einer SUMO1-Modifikation des Hypoxia induzierbaren Faktors 1 alpha (HIF1 α) (Cheng et al., 2007). In der Folge rekrutiert das SUMOylierte HIF1 α das *von Hippel Lindau* (VHL) Protein und wird durch dessen E3 Ubiquitinligaseaktivität ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. In diesem speziellen Fall wird keine SUMO-Kette benötigt, um das Substrat zu erkennen und für den Abbau zu markieren.

Vieles deutet also darauf hin, dass SUMO-Ketten an, aber auch multi-SUMOylierung von Substraten deren Interaktion mit ULS Proteinen vermitteln kann. Abbildung 4.3.1 fasst in einem Modell die Ergebnisse zusammen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass SUMOylierung in vielen Fällen spezifische transiente Interaktionen mit diversen Proteinen ermöglichen kann. Durch die Entdeckung der ULS-Proteine kann die primäre Funktion der SUMO-Modifikation jedoch bei bestimmten Substraten die Markierung für die Ubiquitin-abhängige Proteolyse sein. Das Modell in Abbildung 4.3.1 fasst die Überlegungen zur SUMO-abhängigen Proteolyse zusammen.

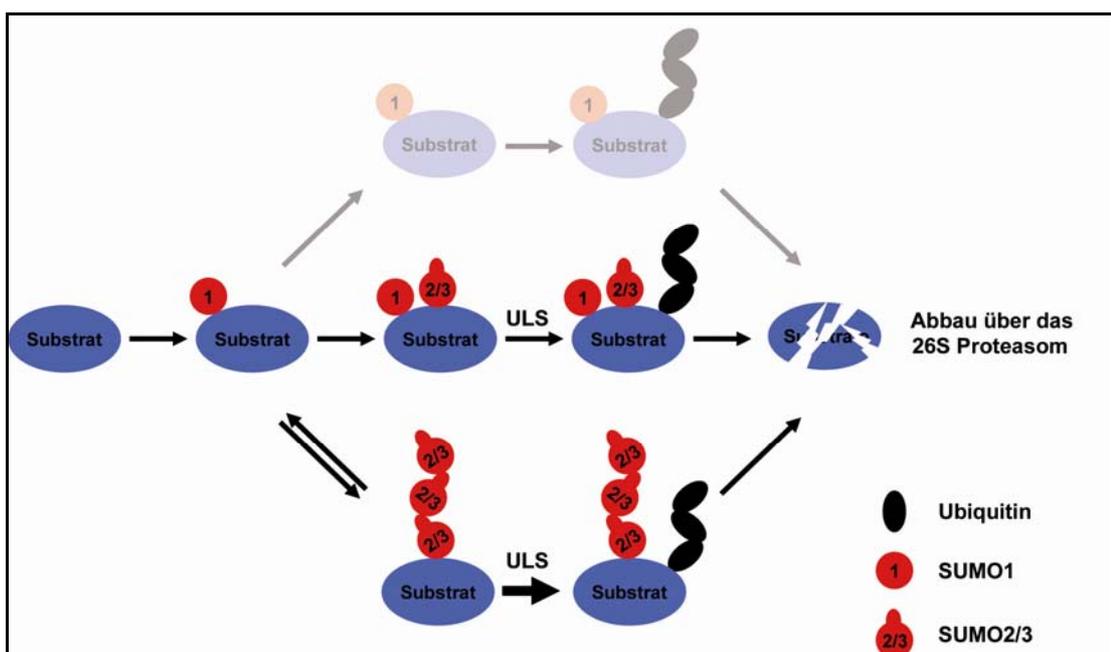


Abb. 4.3.1: Die proteolytische Kontrolle von SUMO-Konjugaten: Modell der Rolle der SUMO-Modifikation beim ULS-vermittelten Abbau von Substraten über das 26S Proteasom. Nach diesem Modell werden Substrate, die nur mit SUMO1 modifiziert werden, nicht durch ULS

Proteine erkannt und folglich auch nicht ubiquitiniert (obere Abzweigung). Erst die Modifikation mit zusätzlichen SUMO-Resten, vorzugsweise SUMO2/3 (Multi-SUMOylierung, mittlere Abzweigung) oder den Anhang von SUMO2/3-Ketten (SUMO-Ketten Bildung, untere Abzweigung) führt zu einer Detektion durch SIM-tragende ULS-Proteine und der darauf folgenden Ubiquitinierung des modifizierten Substrats. Solche Hybridkonjugate werden in der Folge über das 26S Proteasom abgebaut. Der Doppelpfeil bei der unteren Abzweigung soll zeigen, dass SUMO-Ketten spezifische Proteasen einen Einfluss auf den einzuschlagenden Weg haben können, indem sie die SUMO-Modifikation auch wieder rückgängig machen können.

4.3.2 PML ist ein Substrat für die SUMO2/3-abhängige proteolytische Kontrolle

Nachdem gezeigt werden konnte, dass SUMOylierung auch als Signal für die Ubiquitinierung und den nachfolgenden proteasomalen Abbau dienen kann (Anschnitt 4.3.1.), war das Ziel in diesem Teil der Arbeit diesen Mechanismus für ein spezifisches endogenes Substrat nachzuweisen. Ergebnisse früherer Publikationen über das humane PML-Protein gaben erste Hinweise darauf, dass PML als Substrat für diesen Signalweg in Frage kommen kann. Im Jahre 2001 konnte die Arbeitsgruppe von Hugues de Thé zeigen, dass ATO-Behandlung den Abbau von PML und PML-RAR α induziert. Die Zugabe von ATO verursacht eine Mobilitätsverschiebung von SUMOyliertem PML in SDS-Gelen zu höheren molekularen Massen. Nach längerer Inkubation mit ATO war das Protein dann Proteasomabhängig abgebaut worden. Dem Abbau wirkt eine Mutation der SUMOylierungsstelle K160 (PML K160R) entgegen (Lallemand-Breitenbach et al., 2001). Da diese Arbeitsgruppe zum damaligen Zeitpunkt nur die SUMO1 Modifikation und nicht die SUMO2/3-Modifikation von PML untersucht hat, und die Arbeitsgruppe von Jürgen Dohmen zusammen mit unserer Arbeitsgruppe die proteolytische Kontrolle gerade durch diese SUMO2/3-Isoformen entdeckt hatte (Uzunova et al., 2007), rückte PML in den Fokus unseres Interesses.

PML wird bevorzugt von SUMO2/3 nach ATO-Behandlung in doppelt transient transfizierten Zellen modifiziert

Schon die ersten Experimente mit doppelt transfizierten Zellen zeigten einen Einfluss von ATO auf die Myc-SUMO3-Modifikation von überexprimiertem FLAG-PML im Vergleich zu Myc-SUMO1 oder mit Kontrollvektor transfizierten Zellen (Abbildung 3.3.5). Die ATO-spezifischen hochmolekularen Konjugate die sowohl bei der Myc-SUMO3 als auch bei der Myc-SUMO3 K11R-transfizierten Probe in der Höhe von etwa

175 kDa auftreten, könnten dafür sprechen, dass in den ersten Schritten als Antwort auf ATO SUMO-Ketten keine große Rolle spielen. Diese Konjugate, die als Doppelbande auftreten, könnten Intermediate darstellen, die spezifisch mit SUMO2/3 modifiziert sind und in der Folge ein ULS rekrutieren, um Proteasomabhängig abgebaut zu werden.

Diese ersten Ergebnisse sollten in stabilen induzierbaren T-RexTM HeLa-Zelllinien mit den drei konjugierbaren His₆-markierten humanen SUMO-Isoformen und einer Kontroll-Zelllinie eingehender untersucht werden. Der Vorteil dieses System zu verwenden liegt darin, dass mit Hilfe der His-Markierung konjugierte Substrate mittels NiNTA-Affinitätsreinigung angereichert werden können und ein gleichmäßiges Expressionsniveau der SUMO-Isoformen in allen Zellen gewährleistet ist.

Die induzierbaren stabilen T-Rex-HeLa-Zelllinien verhalten sich ähnlich wie wildtypische Zellen

Zunächst mussten die His₆-SUMO-Zelllinien charakterisiert werden, ob sie sich im Hinblick auf MG132-Behandlung analog zu den untransfizierten HeLa B-Zellen aus dem Kapitel zuvor verhalten (Vergleich Abbildung 3.3.1 zu 3.3.6). Die endogenen SUMO2/3-Konjugate akkumulieren nach Proteasominhibition in der His₆-SUMO1- und der Kontrollzelllinie, während endogene SUMO1-Konjugate, analog zu 3.3.1, nicht in der Kontroll- oder den SUMO2- und SUMO3-Zelllinien akkumulieren. Generell zeigen alle His₆-SUMO-Zelllinien einen Anstieg an SUMO-Konjugaten, was dafür spricht, dass die Verfügbarkeit von freiem SUMO einen limitierenden Faktor für die SUMO-Konjugation in untransfizierten Zellen darstellt. Der relative Anstieg von SUMO-Konjugaten in den His₆-SUMO2 und His₆-SUMO3 exprimierenden Zellen durch MG132-Behandlung ist höher als in den His₆-SUMO1-Zelllinien (3.3.6 A). Diese Beobachtung ist mit der Idee konsistent, dass vor allem SUMO2/3-Konjugate effizienter für den Abbau über das Proteasom markiert werden, da die SUMO-Ketten-Bildung die Rekrutierung von ULS-Proteinen mit mehreren SIMs, z.B. RNF4, unterstützt (Uzunova et al., 2007). Dass hier auch eine Akkumulation in den His₆-SUMO1-Zellen zu beobachten ist kann daran liegen, dass nach wie vor endogenes SUMO2/3 vorliegt und dass His₆-SUMO1 vornehmlich als Kettenabschluss an SUMO-Ketten gebunden wird (siehe Abschnitt 4.3.1). Es ist bekannt, dass poly-SUMO-Ketten zumeist aus SUMO2/3 zusammengesetzt sind (Tatham et al., 2001), aber kürzlich wurde nachgewiesen, dass SUMO1 auch an das Ende solcher Ketten konjugiert werden kann (Matic et al., 2008).

Alternativ kann dies aber auch zum Teil auf die Antwort der Zellen auf MG132 zurückgeführt werden, da nämlich die Inhibition des Proteasoms indirekt zu Stress und deshalb zur Erhöhung der SUMO2/3-Konjugation führt. Die Stressantwort zeigt sich auch bei der Hochregulierung der SUMO2/3-Konjugate als Antwort auf die ATO-Behandlung (Abbildung 3.3.7) und ähnelt den Effekten die in anderen Studien mit verschiedenen Stressbedingungen oder in der Abbildung 3.3.2 gezeigt wurden (Saitoh and Hinchey, 2000). Zusammengefasst bilden die stabilen SUMO-Zelllinien ein geeignetes System für die Untersuchung von SUMO-abhängigen Signaltransduktionswegen.

ATO vermittelt die spezifische SUMO2/3 Modifikation von PML

ATO zeigt in den FLAG-PML transfizierten SUMO-Zelllinien, neben dem Anstieg der gesamten SUMO-Konjugate, spezifisch die Induktion der Modifikation von PML mit SUMO2 und SUMO3 (Abbildung 3.3.7 und 3.3.9). Ein Verschwinden von transfiziertem PML als Antwort auf ATO-Behandlung kann in den Zelllinien nicht gezeigt werden. Vermutlich ist die Überexpression von PML zu stark, denn die Untersuchungen mit endogenem PML weisen auf einen Abbau von PML als Antwort auf ATO hin (siehe Abb. 3.3.8). Einzig das Bandenmuster von PML variiert zwischen den verschiedenen Zelllinien und zwischen den verschiedenen Behandlungen der Zellen. Die exakte Zusammensetzung der PML-Banden kann in diesen Experimenten nicht geklärt werden, da sich jede SUMO-Modifikation anders auf das Laufverhalten von PML auswirkt. Selbst einzelne SUMO-Modifikationen an nur einer der drei möglichen SUMOylierungsstellen verändern das Laufverhalten von PML, d.h. ein an Lysin 65 modifiziertes PML verhält sich im SDS-Gel anders als ein an Lysin160 oder Lysin442 modifiziertes PML. So konnten Lallemand-Breitenbach *et al.* zeigen, dass jede mögliche Zusammensetzung aus Mono- oder Di-SUMOyliertem PML ein unterschiedliches Laufverhalten aufweisen (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008).

Das erschwert die Analyse des PML-Bandenmusters in der Abbildung 3.3.9. Klar kann die Bande bei 72 kDa im anti-FLAG Immunblot dem unmodifizierten PML zugeordnet werden, da sie nicht von den anti-His Antikörpern erkannt wird. Die nach ATO-Behandlung auftretende Doppelbande zwischen 130 und 170 kDa in den His₆-SUMO2 und His₆-SUMO3-Zellen trägt mit Sicherheit SUMO2, bzw. SUMO3, da diese nach der Immunpräzipitation von FLAG-PML mit dem His-Antikörper detektiert werden können (Abbildung 3.3.9 B). Im anti-FLAG Immunblot (3.3.9 A) erkennt man in der His₆-SUMO2-Zelllinie, dass die drei prominenten Banden zwischen 80 und 110 kDa in ATO-

behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen stark vermindert werden. ATO hat also einen starken Einfluss auf die Modifikation von PML und SUMO2/3 spielt dabei eine zentrale Rolle.

Verschiedene Erklärungen können dafür in Betracht gezogen werden. Zum einen könnte ATO verschiedene SUMO-E3-Ligasen aktivieren. Möglicherweise induzieren bestimmte SUMO-E3-Ligasen die SUMO2/3-Modifikation an den verschiedenen Lysinen von PML, wobei auch kurze Ketten angehängt werden könnten. Dies würde das Auftreten der Doppelbande in den His₆-SUMO2/3-Zelllinie erklären, die mehrfach Mono-SUMOylierte oder mit kurzen Ketten modifizierte Intermediate darstellen. Diese Intermediate würden dann von ULS-Proteinen erkannt und in der Folge ubiquitiniert und abgebaut werden. Da in den vorliegenden Experimenten das FLAG-PML immer überexprimiert wurde, würde das erklären, warum diese hochmolekularen Intermediate nicht mehr schnell genug abgebaut werden können und angereichert werden. Es könnte aber auch sein, dass diese Intermediate erst von einer weiteren E3-Ligase erkannt werden müssen, die dann die SUMO-Ketten-Modifikation übernimmt, damit das so modifizierte Substrat mit ULS-Proteinen interagieren kann. Als weitere Möglichkeit könnte ATO SUMO-Proteasen (SENPs) deaktivieren die spezifisch SUMO-Ketten erkennen, was dazu führt, dass mehrfach modifizierte Konjugate angereichert werden. So ist bekannt, dass die SUSP1 bevorzugt SUMO2/3-Ketten dekonjugiert (Mukhopadhyay et al., 2006).

Für die Hypothese, dass es sich bei den Intermediaten nur um PML mit kurzen SUMO-Ketten oder um mehrfach Mono-SUMOyliertes PML handelt, sprechen folgende Fakten: Zum einen sind die Doppelbanden klar definiert in ihrer Zusammensetzung, d.h., dass hier keine Ketten mit variabler Länge angefügt sind, die auf einem SDS-Gel nicht aufgelöst werden können. In 3.3.9 B erkennt man sehr gut, dass solche nicht aufgelösten Banden oberhalb dieser Intermediate detektiert werden können, aber nur in ATO-behandelten SUMO2-Zellen. Vermutlich sind dies hochmolekulare PML-Konjugate auf dem Weg zum Proteasom, die unterschiedlich viele SUMO2- oder Ubiquitinketten tragen. Auch das Experiment aus 3.3.5 zeigt, dass es sich um definierte allerhöchstens mit kurzkettigen SUMO2/3 modifizierte PML-Konjugate handelt. Hier sind ebenfalls definierte hochmolekulare Doppelbanden (um 175 kDa) zu erkennen und zwar auch in Proben die mit der Ketten-Mutante Myc-SUMO3 K11R transfiziert sind. All diese Experimente deuten auf eine intermediäre mehrfache Mono-SUMOylierung von PML als Antwort auf ATO, oder die Anknüpfung von definierten kurzen Ketten hin.

Auch in den stabilen Zelllinien ist die SUMOylierungsstelle K160 von PML für die Antwort auf ATO notwendig, denn die Abwesenheit von hochmolekularen His₆-SUMO2/3-Konjugaten bei der K160R-Mutante in Abbildung 3.3.10 ist konsistent mit dem Ergebnis in 3.3.1 und der bereits beschriebenen Resistenz dieser Mutante nach ATO-Behandlung abgebaut zu werden (Lallemand-Breitenbach et al., 2001).

Isoformen PML6 und PML11 verhalten sich wie das PML 1-522-Konstrukt

Die Experimente mit den FLAG-markierten vollständigen Isoformen PML6 und PML11 zeigen, dass die verkürzte Version (FLAG-PML 1-522 *wt*) sich in den Experimenten bezüglich der Antwort auf ATO und MG132 und den jeweiligen His₆-SUMO-Isoformen gleich verhalten. Damit sind die mit FLAG-PML 1-522 *wt* erzielten Ergebnisse auch auf die PML-Isoformen PML6 und PML11 mit vollständigem C-Terminus übertragbar. Damit kann gezeigt werden, dass der konservierte C-Terminus mit seinen drei SUMOylierungsstellen, allen voran Lysin 160, für die Kontrolle des Abbaus von PML von Nöten ist.

ATO-Behandlung führt zu hybriden SUMO-Ubiquitin-PML-Konjugaten

Bis hierhin wurde gezeigt, dass ATO die Modifikation von PML mit SUMO2/3 induziert. Das Lysin K160 spielt dabei eine entscheidende Rolle. Der Nachweis von HA-Ubiquitin auf sequentiell gereinigten hochmolekularen FLAG-PML 1-522 *wt*-SUMO2-Konjugaten (Abbildung 3.3.12) ist ein klares Indiz dafür, dass diese Hybridkonjugate die Zwischenprodukte des ATO-vermittelten proteasomalen Abbaus von PML darstellen. Es ist das erste und bisher einzige Mal, dass solche Hybridkonjugate mit einem spezifischen humanen Substrat, PML, *in vivo* nachgewiesen werden konnten. In parallel erschienenen Studien wurde die gleichzeitige Konjugation von SUMO und Ubiquitin auf PML nur postuliert (Lallemand-Breitenbach et al., 2008) oder die Ubiquitinierung des SUMOylierten PML erfolgte *in vitro* (Tatham et al., 2008). Letztere Arbeit postulierte, dass das Ubiquitin dabei auf dem Substrat und auch auf der SUMO-Kette sitzt. Die Gruppe von Hugues de Thé zeigte, dass stabil transfiziertes His-PML6 in CHO-Zellen (Ursprung: Ovarien des chinesischen Hamsters) durch ATO-Behandlung vermehrt mit SUMO1, SUMO2/3 und Ubiquitin modifiziert wird (Lallemand-Breitenbach et al., 2008). Eine anschließende Analyse der gereinigten PML-Konjugate durch Massenspektrometrie zeigte, dass in unbehandelten Hamster-Zellen His-PML6 nur mit SUMO2 und SUMO3 assoziiert ist. Durch einstündige ATO-Behandlung konnte dann vor allem poly-konjugiertes

SUMO2/3-PML nachgewiesen werden und auch die Modifikation mit SUMO1 und Ubiquitin war detektierbar, letzteres vornehmlich bei den hochmolekularen PML-Formen. Dieses Massenspektrometrie-Ergebnis ist konsistent mit dem Nachweis des Vorhandenseins hybrider SUMO2-Ubiquitin-PML-Konjugate in der vorliegenden Arbeit. Auf der Grundlage ihrer Ergebnisse schlugen Lallemand-Breitenbach *et al.* ein Modell für die molekulare Grundlage für den schrittweisen Abbaumechanismus von PML vor. Sowohl SUMO1 als auch SUMO2/3-Modifikation spielen dabei eine Rolle. K160 scheint vornehmlich durch SUMO2 modifiziert zu werden und dadurch wird wahrscheinlich RNF4 rekrutiert. SUMO1-Modifikation an K65 könnte die RING-Ubc9 Interaktion stabilisieren und so indirekt die SUMO-Ketten-Modifikation an K160 unterstützen und/oder direkt die RNF4 Bindung stabilisieren.

Die Untersuchungen mit endogenem PML (3.3.8) zeigen, dass ATO tatsächlich die posttranslationale Modifikation zu hochmolekularen PML-Konjugaten induziert und dass diese in der Folge auch Proteasom-abhängig abgebaut werden.

PML wird in *trans vivo* Experimenten in *S.cerevisiae* RNF4-vermittelt abgebaut

Im vorangegangenen Kapitel (4.3.1) wurde bereits beschrieben, dass in *S.cerevisiae* RNF4 den Phänotyp der Mutation der ULS-Proteine Hex3 und Slx8 komplementieren kann (Uzunova et al., 2007). In der Literatur gab es zudem einen Hinweis darauf, dass RNF4 mit PML-NBs SUMO1-abhängig interagiert (Hakli et al., 2005). Deshalb führte Kerstin Götttsche aus dem Labor von Jürgen Dohmen erste *trans vivo* Experimente zur Funktion von RNF4 als spezifisches ULS von PML durch. Ein T7-markiertes PML 1-522 *wt*-Konstrukt wurde, wenn es in die Hefe *S.cerevisiae* transformiert wurde, sehr effizient mit der Hefe SUMO-Isoform Smt3 modifiziert (Weisshaar et al., 2008). PML wurde in der Hefe sogar stärker als in den humanen Zellen modifiziert, was für einen zusätzlichen Mechanismus zur Regulation der SUMO-Konjugation/Dekonjugation von PML in humanen Zellen spricht. Diese effiziente Modifikation in der Hefe erlaubte in der Folge spezifische Effekte von gleichzeitig transformiertem RNF4 bei der Herunterregulierung von SUMO-modifiziertem PML nachzuweisen. Zum einen führte die Transformation von RNF4 in die Hefe zu einer generellen Verminderung von hochmolekularen SUMO-Konjugaten im Vergleich zu Kontrollzellen. Zum anderen führte RNF4 auch zu einer Abnahme hochmolekularer PML-SUMO-Konjugate bei PML- und RNF4-transformierten Zellen (Weisshaar et al., 2008). Daraus kann geschlossen werden, dass RNF4 *S.cerevisiae*-Smt3-modifizierte Proteine, darunter auch spezifisch PML, erkennt. In Verbindung mit den

Ergebnissen der *in vitro*-Ubiquitinierung von SUMOylierten PML von Kirstin Keusekotten (siehe 4.2.1) bestätigt sich die Annahme, dass RNF4 als ULS-Protein arbeitet und PML als erstes humanes Substrat für den ULS-vermittelten Abbau identifiziert wurde. (Weisshaar et al., 2008).

RNF4 ist das spezifische ULS von PML

Parallel zu unseren Arbeitsgruppen konnten zwei andere Gruppen nachweisen, dass das humane ULS RNF4 die Ubiquitin-E3-Ligase für SUMO-modifiziertes PML ist (Lallemant-Breitenbach et al., 2008; Tatham et al., 2008; Weisshaar et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Ronald Hay konnte zeigen, dass RNF4 scheinbar mit allen SUMO-Isoformen interagieren kann, aber dass die SUMO-Ketten-Bildung bei der Interaktion mit PML eine entscheidende Rolle spielt. SUMO1 könnte dabei die Rolle des Kettenabschlusses spielen, so dass poly-SUMO-Ketten aus SUMO2/3 und einem abschließenden SUMO1 gebildet werden und so auch mit RNF4 interagieren können (Hecker et al., 2006; Tatham et al., 2008).

Da in den in dieser vorliegenden Doktorarbeit durchgeführten Experimenten, auch bei den sequentiellen Reinigungen, immer auch endogenes SUMO vorhanden ist, konnte die Zusammensetzung der Ketten, die an PML aller Wahrscheinlichkeit nach an K160 gebunden sind, nicht vollständig aufgeschlüsselt werden. SUMO2/3 sind mit Sicherheit an der Modifikation von PML für die Markierung zum ULS-vermittelten Abbau beteiligt, aber inwiefern SUMO1 *in vivo* dabei eine wichtige Rolle spielt oder nicht, kann anhand der bisherigen Ergebnisse nicht endgültig geklärt werden. Im von Kirstin Keusekotten durchgeführten *in vitro* Experiment (Abbildung 4.2.1) zeigt sich aber, dass das Vorhandensein von nur mit SUMO3-modifiziertem PML ausreicht, eine Interaktion mit RNF4 herzustellen, um in der Folge ubiquitiniert zu werden. Zeitgleich zeigte dieses *in vitro* Experiment, dass auch eine SUMO1-Modifikation ausreicht, um PML-RBI mit der Hilfe von RNF4 zu ubiquitinieren, dass aber hierbei die Effizienz weit hinter den SUMO3-modifizierten Konstrukten zurückbleibt (Weisshaar et al., 2008).

Die Gruppe von Ronald Hay erbrachte den Nachweis, dass endogenes PML durch ATO-Behandlung abgebaut wird, indem sie den Abbau durch den Einsatz von RNF4-spezifischer siRNA (*small interfering RNA*) verhindern und hochmolekulare PML-Konjugate identifizieren können. Weiterhin zeigten sie, dass RNF4 *in vitro* SUMO-Ketten besser ubiquitiniert als Mono-SUMO und weisen somit auch die Ubiquitin-E3-Aktivität von RNF4 nach. Zudem zeigten sie, dass endogenes PML in unbehandelten Zellen durch

den Einsatz von siRNA gegen RNF4 in den PML-NBs akkumuliert und dass RNF4 auch im normalen zellulären Ablauf ohne die Stressinduktion durch ATO den Umsatz von PML reguliert (Tatham et al., 2008).

In der Abbildung 4.3.2 wird ein Modell für den ULS-abhängigen Abbau von PML präsentiert, das die Resultate von Lallemand-Breitenbach *et al.* zusammenführt.

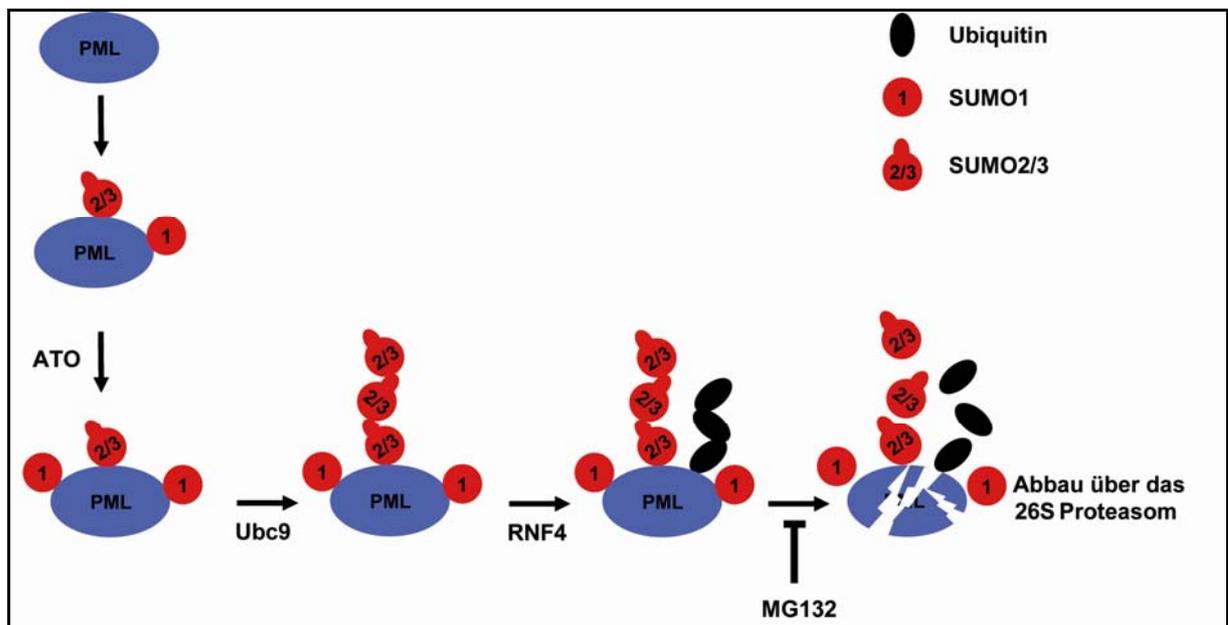


Abb. 4.3.1: Die proteolytische Kontrolle von PML nach Lallemand-Breitenbach *et al.*: In diesem Modell werden die einzelnen Schritte aufgeführt, die zum Abbau von PML über das 26S Proteasom führen. PML liegt in unbehandelten Zellen hauptsächlich mit SUMO2/3 an K160 und mit SUMO1 an K442/490 gebunden vor (Lallemand-Breitenbach et al., 2008). Durch ATO wird die Modifikation von K160 mit SUMO2/3-Ketten initialisiert, wobei die SUMO1-Modifikation an K65 die Kettenbildung unterstützt indem das SUMO-E2 Ubc9 rekrutiert wird (Lallemand-Breitenbach et al., 2008). Durch die angehängte SUMO2/3-Kette, wahrscheinlich auch begünstigt durch SUMO-Modifikationen an den anderen SUMOylierungsstellen, wird das ULS RNF4 rekrutiert, das die Ubiquitinierung von PML steuert. Abschließend werden diese Hybridkonjugate über das Proteasom abgebaut, der Proteasominhibitor MG132 kann diesen Schritt unterbinden

In den His₆-SUMO1-Zelllinien in Abbildung 3.3.9 B dieser Arbeit erkennt man, dass durch ATO eine prominente Bande in Höhe von 170 kDa erscheint, die auf der gleichen Höhe liegt, wie die obere Bande der Doppelbande, die nach ATO-Behandlung in den His₆-SUMO2 und His₆-SUMO3 besonders stark auftritt. Auch erkennt man über dieser einzelnen Bande in His₆-SUMO1-Zellen einen Schmier, der PML auf dem Wege zum Abbau über das UPS darstellen könnte. So würde aus der Verbindung zu den Daten von Lallemand-Breitenbach *et al.* und den hier gezeigten Daten die obere Bande aus PML bestehen, das an K65 SUMO1 trägt und deshalb an K160 mit SUMO2/3 modifiziert wurde. Um diesen Sachverhalt aber näher aufzuschlüsseln müssten Versuche mit PML-

Konstrukten in den SUMO-Zelllinien durchgeführt werden, bei denen einzelne SUMOylierungsstellen mutiert wurden (K65R oder auch K442R).

Das Modell zum ATO vermittelten Abbau vom PML über das Ubiquitin/Proteasom-System (UPS)

Zusammen mit den Ergebnissen weiterer Veröffentlichungen kann folgendes Bild für die Rolle der PML-NBs gezeichnet werden. Die PML-NBs bilden danach ein SUMO-reguliertes Umfeld, das den Umsatz SUMOylierter Proteine steuert. Die SUMOylierung durch SUMO2/3 an K160 von PML induziert dabei die Aggregation von RNF4, verschiedenen SUMOylierten Proteinen, Polyubiquitin und dem Proteasom, das an PML-NBs assoziiert bereits nachgewiesen wurde und sorgt so für einen konstitutiven Abbau von PML (Anton et al., 1999; Fabunmi et al., 2001; Lallemand-Breitenbach et al., 2008; Lallemand-Breitenbach et al., 2001; Muller et al., 1998). Als Indiz dafür zeigt sich, dass PML-Mutanten (K160R), dominant-negatives RNF4 oder die Proteasominhibition zur Bildung abnormaler PML-NBs führt. In dieser und den parallel erschienen Arbeiten konnte ATO als Auslöser für den Abbau von PML durch SUMO-abhängige proteolytische Kontrolle identifiziert werden (Lallemand-Breitenbach et al., 2008; Tatham et al., 2008; Weisshaar et al., 2008).

Auf die gleiche Weise wird auch das PML-RAR α -Fusionsprotein nach ATO-Behandlung K160-abhängig abgebaut und die APL-Zellen können sich differenzieren oder treten in die Apoptose ein. Offen bleibt in diesem Modell die Frage, über welchen Signaltransduktionsweg ATO die SUMOylierung von PML induziert, damit PML und PML-RAR α RNF4-abhängig über das Proteasom abgebaut werden können. ATO könnte dabei entweder einen noch näher zu charakterisierenden Signalweg aktivieren, der die SUMO2/3-Konjugation von PML initiiert oder alternativ die Dekonjugation von SUMO2/3-Ketten unterbindet. Aus verschiedenen Veröffentlichungen ist hervorgegangen, dass PML auch phosphoryliert werden kann und dies den Abbau reguliert (Hayakawa and Privalsky, 2004; Scaglioni et al., 2006). ATO könnte diese posttranslationale Modifikation bei PML, aber auch bei RNF4, initiieren, indem spezifische Kinasen aktiviert würden und so die SUMOylierung und die anschließende Ubiquitinierung von PML steuern.

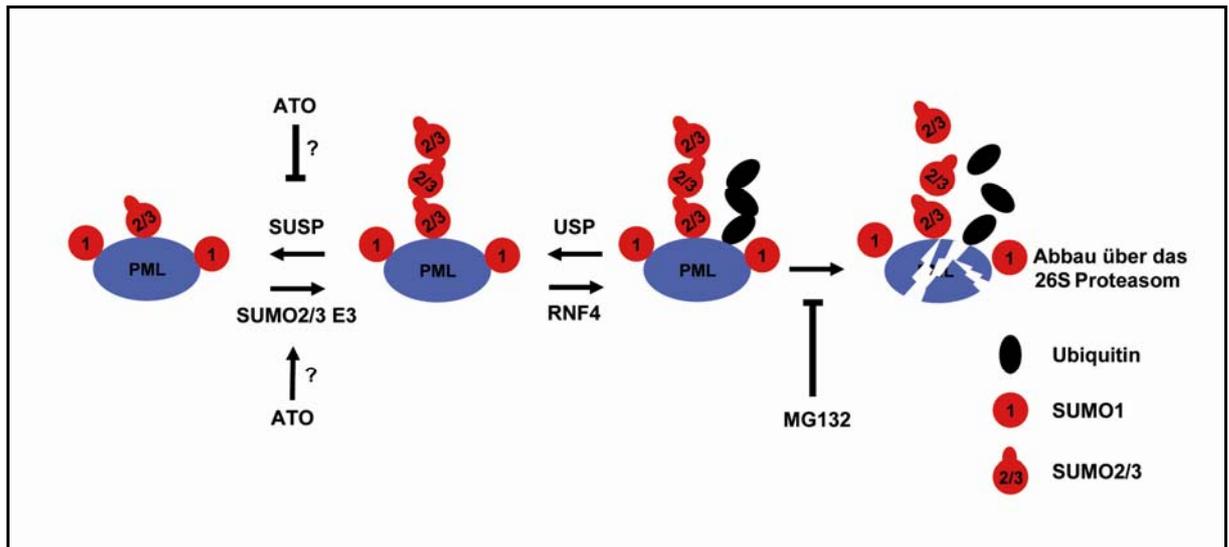


Abb. 4.3.2: Die proteolytische Kontrolle von PML: In diesem Modell, das die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammenfasst, werden die einzelnen Schritte aufgeführt, die zum Abbau von PML über UPS führen. PML liegt in unbehandelten Zellen in einfach bis mehrfach Mono-SUMOylierter Form vor (die genaue Komposition muss noch aufgeschlüsselt werden). Durch ATO wird die Modifikation an K160 mit SUMO2/3-Ketten initiiert; dies kann zum einen durch ATO-vermittelte SUMO2/3 E3 Aktivität erfolgen, oder durch die Inhibition spezifischer SUSPs (SUMO spezifische Proteasen), die SUMO-Ketten sonst ständig abbauen würden. Es erfolgt die Rekrutierung von RNF4, das die Ubiquitinierung initiiert, die durch USP (Ubiquitinspezifische Proteasen) rückgängig gemacht werden könnte. Die resultierenden Hybridkonjugate werden dann über das 26S Proteasom abgebaut. Dieser letzte Schritt kann durch Proteasominhibitor (MG132) verhindert werden.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse sind konsistent mit denen, die im letzten halben Jahr von anderen Gruppen präsentiert wurden. PML ist damit das erste Substrat für das nachgewiesen wurde, dass es über den in Hefe und Menschen entdeckten SUMOylierungs-abhängigen Signalweg proteasomal abgebaut wird. Aus den Daten aus dieser Arbeit lässt sich folgendes Modell erstellen (Abbildung 4.3.2), in dem versucht wird alle vorhandenen Daten sinnvoll zusammenzufassen. ATO verursacht nach diesem Modell vor allem die SUMO2/3 Kettenbildung, wahrscheinlich an K160 von PML, entweder durch Aktivierung spezifischer SUMO E3-Ligasen oder durch die Inhibition spezifischer SUSPs, die der SUMO2/3-Kettenbildung entgegenwirken. ATO hat in dem Modell von Lallemand-Breitenbach *et al.* zusätzlich starken Einfluss auf die SUMO1-Modifikation von PML, was mit den Daten der vorliegenden Arbeit nicht konform ist. Hier spielt vor allem die SUMO2/3 Modifikation im Anschluss auf eine ATO-Antwort der Zellen die zentrale Rolle bei dem UPS-vermittelten Abbau von PML. Nachfolgend wird das poly- und multi-SUMOylierte PML von RNF4 als Substrat erkannt und ubiquitiniert. Als letzter möglicher Ausweg vor dem Abbau durch das Proteasom könnte noch ein Abschneiden der Ubiquitin-Ketten durch spezifische Ubiquitin Dekonjugasen erfolgen. Eine solche Regulation könnte im Fall von PML z.B. durch die Ubiquitin Dekonjugase

HAUSP erfolgen, die der Ubiquitinierung von PML durch die Ubiquitin E3-Ligase ICP0 aus Herpes Simplex Virus entgegenwirkt.

5 Literaturverzeichnis

Akao, Y., Yamada, H., and Nakagawa, Y. (2000). Arsenic-induced apoptosis in malignant cells in vitro. *Leuk Lymphoma* 37, 53-63.

Alcalay, M., Tomassoni, L., Colombo, E., Stoldt, S., Grignani, F., Fagioli, M., Szekely, L., Helin, K., and Pelicci, P.G. (1998). The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 18, 1084-1093.

Andrade, L.E., Chan, E.K., Raska, I., Peebles, C.L., Roos, G., and Tan, E.M. (1991). Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *J Exp Med* 173, 1407-1419.

Anton, L.C., Schubert, U., Bacik, I., Princiotta, M.F., Wearsch, P.A., Gibbs, J., Day, P.M., Realini, C., Rechsteiner, M.C., Bennink, J.R., et al. (1999). Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J Cell Biol* 146, 113-124.

Ascoli, C.A., and Maul, G.G. (1991). Identification of a novel nuclear domain. *J Cell Biol* 112, 785-795.

Ayaydin, F., and Dasso, M. (2004). Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues. *Mol Biol Cell* 15, 5208-5218.

Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N., and Elledge, S.J. (2002). The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II. *Mol Cell* 9, 1169-1182.

Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280, 275-286.

Bernardi, R., and Pandolfi, P.P. (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 1006-1016.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P.G., and Dejean, A. (2002). Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO J* 21, 3358-3369.

Block, G.J., Eskiw, C.H., Dellaire, G., and Bazett-Jones, D.P. (2006). Transcriptional regulation is affected by subnuclear targeting of reporter plasmids to PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* 26, 8814-8825.

Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L.D., Solomon, E., and Freemont, P.S. (1996). PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* 13, 971-982.

Bode, A., and Dong, Z. (2000). Apoptosis induction by arsenic: mechanisms of action and possible clinical applications for treating therapy-resistant cancers. *Drug Resist Updat* 3, 21-29.

Boisvert, F.M., Hendzel, M.J., and Bazett-Jones, D.P. (2000). Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J Cell Biol* 148, 283-292.

Borden, K.L. (2002). Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* 22, 5259-5269.

Borden, K.L., CampbellDwyer, E.J., and Salvato, M.S. (1997). The promyelocytic leukemia protein PML has a pro-apoptotic activity mediated through its RING domain. *FEBS Lett* 418, 30-34.

Borden, K.L., and Freemont, P.S. (1996). The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol* 6, 395-401.

Borden, K.L., Lally, J.M., Martin, S.R., O'Reilly, N.J., Solomon, E., and Freemont, P.S. (1996). In vivo and in vitro characterization of the B1 and B2 zinc-binding domains from the acute promyelocytic leukemia protooncogene PML. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1601-1606.

Borrow, J., Goddard, A.D., Sheer, D., and Solomon, E. (1990). Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science* 249, 1577-1580.

Boutell, C., and Everett, R.D. (2003). The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) regulatory protein ICP0 interacts with and Ubiquitinates p53. *J Biol Chem* 278, 36596-36602.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Bylebyl, G.R., Belichenko, I., and Johnson, E.S. (2003). The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *J Biol Chem* 278, 44113-44120.

Cai, X., Shen, Y.L., Zhu, Q., Jia, P.M., Yu, Y., Zhou, L., Huang, Y., Zhang, J.W., Xiong, S.M., Chen, S.J., et al. (2000). Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 14, 262-270.

Carvalho, T., Seeler, J.S., Ohman, K., Jordan, P., Pettersson, U., Akusjarvi, G., Carmo-Fonseca, M., and Dejean, A. (1995). Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Biol* 131, 45-56.

Chelbi-Alix, M.K., and de The, H. (1999). Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* 18, 935-941.

Chen, G.Q., Shi, X.G., Tang, W., Xiong, S.M., Zhu, J., Cai, X., Han, Z.G., Ni, J.H., Shi, G.Y., Jia, P.M., et al. (1997). Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute

promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 89, 3345-3353.

Chen, G.Q., Zhu, J., Shi, X.G., Ni, J.H., Zhong, H.J., Si, G.Y., Jin, X.L., Tang, W., Li, X.S., Xong, S.M., et al. (1996). In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood* 88, 1052-1061.

Chen, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., and Lin, J.K. (1998). Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 177, 324-333.

Cheng, J., Kang, X., Zhang, S., and Yeh, E.T. (2007). SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell* 131, 584-595.

Cohen, N., Sharma, M., Kentsis, A., Perez, J.M., Strudwick, S., and Borden, K.L. (2001). PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *EMBO J* 20, 4547-4559.

Collavin, L., Gostissa, M., Avolio, F., Secco, P., Ronchi, A., Santoro, C., and Del Sal, G. (2004). Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8870-8875.

Colombo, R., Boggio, R., Seiser, C., Draetta, G.F., and Chiocca, S. (2002). The adenovirus protein Gam1 interferes with sumoylation of histone deacetylase 1. *EMBO Rep* 3, 1062-1068.

Condemine, W., Takahashi, Y., Le Bras, M., and de The, H. (2007). A nucleolar targeting signal in PML-I addresses PML to nucleolar caps in stressed or senescent cells. *J Cell Sci* 120, 3219-3227.

Condemine, W., Takahashi, Y., Zhu, J., Puvion-Dutilleul, F., Guegan, S., Janin, A., and de The, H. (2006). Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms. *Cancer Res* 66, 6192-6198.

Craig, K.L., and Tyers, M. (1999). The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Prog Biophys Mol Biol* 72, 299-328.

Daniel, M.T., Koken, M., Romagne, O., Barbey, S., Bazarbachi, A., Stadler, M., Guillemain, M.C., Degos, L., Chomienne, C., and de The, H. (1993). PML protein expression in hematopoietic and acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 82, 1858-1867.

de Stanchina, E., Querido, E., Narita, M., Davuluri, R.V., Pandolfi, P.P., Ferbeyre, G., and Lowe, S.W. (2004). PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* 13, 523-535.

de The, H., Chomienne, C., Lanotte, M., Degos, L., and Dejean, A. (1990). The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347, 558-561.

- Dellaire, G., and Bazett-Jones, D.P. (2004). PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 26, 963-977.
- Dellaire, G., and Bazett-Jones, D.P. (2007). Beyond repair foci: subnuclear domains and the cellular response to DNA damage. *Cell Cycle* 6, 1864-1872.
- Dellaire, G., Ching, R.W., Dehghani, H., Ren, Y., and Bazett-Jones, D.P. (2006a). The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. *J Cell Sci* 119, 1026-1033.
- Dellaire, G., Eskiw, C.H., Dehghani, H., Ching, R.W., and Bazett-Jones, D.P. (2006b). Mitotic accumulations of PML protein contribute to the re-establishment of PML nuclear bodies in G1. *J Cell Sci* 119, 1034-1042.
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T. (1998). SUMO-1 modification of I κ B inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell* 2, 233-239.
- Dohmen, R.J. (2003a). Ubiquitin/proteasome system. In *Molecular pharmacology: an encyclopedic reference*, S.O.a.W. Rosenthal, ed. (Heidelberg, Springer), pp. p. 943-948.
- Dohmen, R.J. (2003b). Ubiquitin-related modifiers. In *Molecular pharmacology: an encyclopedic reference*, S.O.a.W. Rosenthal, ed. (Heidelberg, Springer), pp. p. 948-951.
- Dohmen, R.J. (2004). SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta* 1695, 113-131.
- Dundr, M., Misteli, T., and Olson, M.O. (2000). The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol* 150, 433-446.
- Dunker, A.K., Cortese, M.S., Romero, P., Iakoucheva, L.M., and Uversky, V.N. (2005). Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS J* 272, 5129-5148.
- Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de The, H., Hay, R.T., and Freemont, P.S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112 (Pt 3), 381-393.
- Dyck, J.A., Maul, G.G., Miller, W.H., Jr., Chen, J.D., Kakizuka, A., and Evans, R.M. (1994). A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 76, 333-343.
- Eskiw, C.H., Dellaire, G., and Bazett-Jones, D.P. (2004). Chromatin contributes to structural integrity of promyelocytic leukemia bodies through a SUMO-1-independent mechanism. *J Biol Chem* 279, 9577-9585.
- Eskiw, C.H., Dellaire, G., Mymryk, J.S., and Bazett-Jones, D.P. (2003). Size, position and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly. *J Cell Sci* 116, 4455-4466.
- Everett, R.D., and Chelbi-Alix, M.K. (2007). PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89, 819-830.

- Everett, R.D., Freemont, P., Saitoh, H., Dasso, M., Orr, A., Kathoria, M., and Parkinson, J. (1998). The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J Virol* 72, 6581-6591.
- Fabunmi, R.P., Wigley, W.C., Thomas, P.J., and DeMartino, G.N. (2001). Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. *J Cell Sci* 114, 29-36.
- Fagioli, M., Alcalay, M., Pandolfi, P.P., Venturini, L., Mencarelli, A., Simeone, A., Acampora, D., Grignani, F., and Pelicci, P.G. (1992). Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms. *Oncogene* 7, 1083-1091.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S.W. (2000). PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 14, 2015-2027.
- Flenghi, L., Fagioli, M., Tomassoni, L., Pileri, S., Gambacorta, M., Pacini, R., Grignani, F., Casini, T., Ferrucci, P.F., Martelli, M.F., et al. (1995). Characterization of a new monoclonal antibody (PG-M3) directed against the aminoterminal portion of the PML gene product: immunocytochemical evidence for high expression of PML proteins on activated macrophages, endothelial cells, and epithelia. *Blood* 85, 1871-1880.
- Flood, F., Murphy, S., Cowburn, R.F., Lannfelt, L., Walker, B., and Johnston, J.A. (2005). Proteasome-mediated effects on amyloid precursor protein processing at the gamma-secretase site. *Biochem J* 385, 545-550.
- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P.P., Will, H., Schneider, C., and Del Sal, G. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *Embo J* 19, 6185-6195.
- Gan-Erdene, T., Nagamalleswari, K., Yin, L., Wu, K., Pan, Z.Q., and Wilkinson, K.D. (2003). Identification and characterization of DEN1, a deneddylase of the ULP family. *J Biol Chem* 278, 28892-28900.
- Gocke, C.B., Yu, H., and Kang, J. (2005). Systematic identification and analysis of mammalian small ubiquitin-like modifier substrates. *J Biol Chem* 280, 5004-5012.
- Gong, L., and Yeh, E.T. (2006). Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem* 281, 15869-15877.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M., and Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* 18, 6462-6471.
- Grad, J.M., Bahlis, N.J., Reis, I., Oshiro, M.M., Dalton, W.S., and Boise, L.H. (2001). Ascorbic acid enhances arsenic trioxide-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells. *Blood* 98, 805-813.

Grande, M.A., van der Kraan, I., van Steensel, B., Schul, W., de The, H., van der Voort, H.T., de Jong, L., and van Driel, R. (1996). PML-containing nuclear bodies: their spatial distribution in relation to other nuclear components. *J Cell Biochem* 63, 280-291.

Grignani, F., Testa, U., Rogaia, D., Ferrucci, P.F., Samoggia, P., Pinto, A., Aldinucci, D., Gelmetti, V., Fagioli, M., Alcalay, M., et al. (1996). Effects on differentiation by the promyelocytic leukemia PML/RARalpha protein depend on the fusion of the PML protein dimerization and RARalpha DNA binding domains. *EMBO J* 15, 4949-4958.

Guldner, H.H., Szostecki, C., Grotzinger, T., and Will, H. (1992). IFN enhance expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 149, 4067-4073.

Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W., and Pandolfi, P.P. (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 730-736.

Gurrieri, C., Capodieci, P., Bernardi, R., Scaglioni, P.P., Nafa, K., Rush, L.J., Verbel, D.A., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2004). Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *J Natl Cancer Inst* 96, 269-279.

Hakli, M., Karvonen, U., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (2005). SUMO-1 promotes association of SNURF (RNF4) with PML nuclear bodies. *Exp Cell Res* 304, 224-233.

Hakli, M., Lorick, K.L., Weissman, A.M., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (2004). Transcriptional coregulator SNURF (RNF4) possesses ubiquitin E3 ligase activity. *FEBS Lett* 560, 56-62.

Hanahan, D., and Meselson, M. (1983). Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* 100, 333-342.

Hannich, J.T., Lewis, A., Kroetz, M.B., Li, S.J., Heide, H., Emili, A., and Hochstrasser, M. (2005). Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280, 4102-4110.

Hay, R.T. (2007). SUMO-specific proteases: a twist in the tail. *Trends Cell Biol* 17, 370-376.

Hayakawa, F., and Privalsky, M.L. (2004). Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis. *Cancer Cell* 5, 389-401.

Hecker, C.M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., and Dikic, I. (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* 281, 16117-16127.

Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.

Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258, 8206-8214.

Hicke, L. (1997). Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *FASEB J* 11, 1215-1226.

Hodges, M., Tissot, C., Howe, K., Grimwade, D., and Freemont, P.S. (1998). Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am J Hum Genet* 63, 297-304.

Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.

Hoppe, A., Beech, S.J., Dimmock, J., and Leppard, K.N. (2006). Interaction of the adenovirus type 5 E4 Orf3 protein with promyelocytic leukemia protein isoform II is required for ND10 disruption. *J Virol* 80, 3042-3049.

Ito, K., Bernardi, R., Morotti, A., Matsuoka, S., Saglio, G., Ikeda, Y., Rosenblatt, J., Avigan, D.E., Teruya-Feldstein, J., and Pandolfi, P.P. (2008). PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature* 453, 1072-1078.

Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P.S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223-7233.

Johnson, E.S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73, 355-382.

Johnson, E.S., and Gupta, A.A. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106, 735-744.

Kagey, M.H., Melhuish, T.A., and Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113, 127-137.

Kahyo, T., Nishida, T., and Yasuda, H. (2001). Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* 8, 713-718.

Kamashev, D., Vitoux, D., and De The, H. (2004). PML-RARA-RXR oligomers mediate retinoid and rexinoid/cAMP cross-talk in acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *J Exp Med* 199, 1163-1174.

Kawabe, Y., Seki, M., Seki, T., Wang, W.S., Imamura, O., Furuichi, Y., Saitoh, H., and Enomoto, T. (2000). Covalent modification of the Werner's syndrome gene product with the ubiquitin-related protein, SUMO-1. *J Biol Chem* 275, 20963-20966.

Kentsis, A., Gordon, R.E., and Borden, K.L. (2002). Self-assembly properties of a model RING domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 667-672.

Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 159-180.

Kirsh, O., Seeler, J.S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., et al. (2002). The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J* 21, 2682-2691.

Knipscheer, P., Flotho, A., Klug, H., Olsen, J.V., van Dijk, W.J., Fish, A., Johnson, E.S., Mann, M., Sixma, T.K., and Pichler, A. (2008). Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Mol Cell* 31, 371-382.

Koken, M.H., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M.K., Sobczak-Thepot, J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F., and de The, H. (1995). The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* 10, 1315-1324.

Koken, M.H., Puvion-Dutilleul, F., Guillemain, M.C., Viron, A., Linares-Cruz, G., Stuurman, N., de Jong, L., Szosteki, C., Calvo, F., Chomienne, C., et al. (1994). The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *Embo J* 13, 1073-1083.

Kosoy, A., Calonge, T.M., Outwin, E.A., and O'Connell, M.J. (2007). Fission yeast Rnf4 homologs are required for DNA repair. *J Biol Chem* 282, 20388-20394.

Kumar, P.P., Bischof, O., Purbey, P.K., Notani, D., Urlaub, H., Dejean, A., and Galande, S. (2007). Functional interaction between PML and SATB1 regulates chromatin-loop architecture and transcription of the MHC class I locus. *Nat Cell Biol* 9, 45-56.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lai, H.K., and Borden, K.L. (2000). The promyelocytic leukemia (PML) protein suppresses cyclin D1 protein production by altering the nuclear cytoplasmic distribution of cyclin D1 mRNA. *Oncogene* 19, 1623-1634.

Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B., and de The, H. (2008). Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* 10, 547-555.

Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honore, N., Doubeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P.P., Puvion, E., Freemont, P., et al. (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) sumoylation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med* 193, 1361-1371.

Lanctot, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G., and Cremer, T. (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* 8, 104-115.

Lavau, C., Marchio, A., Fagioli, M., Jansen, J., Falini, B., Lebon, P., Grosveld, F., Pandolfi, P.P., Pelicci, P.G., and Dejean, A. (1995). The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene* 11, 871-876.

Le, X.F., Yang, P., and Chang, K.S. (1996). Analysis of the growth and transformation suppressor domains of promyelocytic leukemia gene, PML. *J Biol Chem* 271, 130-135.

Lee, P.S., Chang, C., Liu, D., and Derynck, R. (2003). Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling. *J Biol Chem* 278, 27853-27863.

- Li, S.J., and Hochstrasser, M. (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* *398*, 246-251.
- Li, S.J., and Hochstrasser, M. (2000). The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol Cell Biol* *20*, 2367-2377.
- Li, Y., Wang, H., Wang, S., Quon, D., Liu, Y.W., and Cordell, B. (2003). Positive and negative regulation of APP amyloidogenesis by sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 259-264.
- Lin, D.Y., Huang, Y.S., Jeng, J.C., Kuo, H.Y., Chang, C.C., Chao, T.T., Ho, C.C., Chen, Y.C., Lin, T.P., Fang, H.I., et al. (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell* *24*, 341-354.
- Lin, H.K., Bergmann, S., and Pandolfi, P.P. (2004). Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling. *Nature* *431*, 205-211.
- Lin, X., Sun, B., Liang, M., Liang, Y.Y., Gast, A., Hildebrand, J., Brunnicardi, F.C., Melchior, F., and Feng, X.H. (2003). Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell* *11*, 1389-1396.
- Liu, K.D., Gaffen, S.L., and Goldsmith, M.A. (1998). JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol* *10*, 271-278.
- Liu, T.X., Zhang, J.W., Tao, J., Zhang, R.B., Zhang, Q.H., Zhao, C.J., Tong, J.H., Lanotte, M., Waxman, S., Chen, S.J., et al. (2000). Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* *96*, 1496-1504.
- Liu, Y.C., Pan, J., Zhang, C., Fan, W., Collinge, M., Bender, J.R., and Weissman, S.M. (1999). A MHC-encoded ubiquitin-like protein (FAT10) binds noncovalently to the spindle assembly checkpoint protein MAD2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 4313-4318.
- Long, J., Wang, G., He, D., and Liu, F. (2004). Repression of Smad4 transcriptional activity by SUMO modification. *Biochem J* *379*, 23-29.
- Luciani, J.J., Depetris, D., Usson, Y., Metzler-Guillemain, C., Mignon-Ravix, C., Mitchell, M.J., Megarbane, A., Sarda, P., Sirma, H., Moncla, A., et al. (2006). PML nuclear bodies are highly organised DNA-protein structures with a function in heterochromatin remodelling at the G2 phase. *J Cell Sci* *119*, 2518-2531.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* *88*, 97-107.
- Mahajan, R., Gerace, L., and Melchior, F. (1998). Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J Cell Biol* *140*, 259-270.

Mannen, H., Tseng, H.M., Cho, C.L., and Li, S.S. (1996). Cloning and expression of human homolog HSMT3 to yeast SMT3 suppressor of MIF2 mutations in a centromere protein gene. *Biochem Biophys Res Commun* 222, 178-180.

Matera, A.G. (1999). Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol* 9, 302-309.

Matic, I., van Hagen, M., Schimmel, J., Macek, B., Ogg, S.C., Tatham, M.H., Hay, R.T., Lamond, A.I., Mann, M., and Vertegaal, A.C. (2008). In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol Cell Proteomics* 7, 132-144.

Matunis, M.J., Coutavas, E., and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135, 1457-1470.

Matunis, M.J., Wu, J., and Blobel, G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 140, 499-509.

Maul, G.G., Negorev, D., Bell, P., and Ishov, A.M. (2000). Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol* 129, 278-287.

Meinecke, A. (2008). Etablierung stabiler SUMO-Zelllinien zur Untersuchung des SUMO-abhängigen Proteinabbaus. Diplomarbeit.

Melchior, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 591-626.

Melchior, F., Schergaut, M., and Pichler, A. (2003). SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci* 28, 612-618.

Melnick, A., and Licht, J.D. (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93, 3167-3215.

Miller, W.H., Jr. (2002). Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells. *Oncologist* 7 Suppl 1, 14-19.

Miyauchi, Y., Yogosawa, S., Honda, R., Nishida, T., and Yasuda, H. (2002). Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes. *J Biol Chem* 277, 50131-50136.

Mukhopadhyay, D., Ayaydin, F., Kolli, N., Tan, S.H., Anan, T., Kametaka, A., Azuma, Y., Wilkinson, K.D., and Dasso, M. (2006). SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *J Cell Biol* 174, 939-949.

Muller, S., Matunis, M.J., and Dejean, A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 17, 61-70.

NCBI. NCBI Protein Database.

Nervi, C., Ferrara, F.F., Fanelli, M., Rippo, M.R., Tomassini, B., Ferrucci, P.F., Ruthardt, M., Gelmetti, V., Gambacorti-Passerini, C., Diverio, D., et al. (1998). Caspases mediate retinoic acid-induced degradation of the acute promyelocytic leukemia PML/RARalpha fusion protein. *Blood* 92, 2244-2251.

Niikura, T., Hashimoto, Y., Tajima, H., Ishizaka, M., Yamagishi, Y., Kawasumi, M., Nawa, M., Terashita, K., Aiso, S., and Nishimoto, I. (2003). A tripartite motif protein TRIM11 binds and destabilizes Humanin, a neuroprotective peptide against Alzheimer's disease-relevant insults. *Eur J Neurosci* 17, 1150-1158.

Nishida, T., Tanaka, H., and Yasuda, H. (2000). A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. *Eur J Biochem* 267, 6423-6427.

Nisole, S., Stoye, J.P., and Saib, A. (2005). TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 3, 799-808.

Okuma, T., Honda, R., Ichikawa, G., Tsumagari, N., and Yasuda, H. (1999). In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 693-698.

Okura, T., Gong, L., Kamitani, T., Wada, T., Okura, I., Wei, C.F., Chang, H.M., and Yeh, E.T. (1996). Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol* 157, 4277-4281.

Owerbach, D., McKay, E.M., Yeh, E.T., Gabbay, K.H., and Bohren, K.M. (2005). A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 517-520.

Pan, Z.Q., Kentsis, A., Dias, D.C., Yamoah, K., and Wu, K. (2004). Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene* 23, 1985-1997.

Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P., et al. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207-210.

Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A., and Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108, 109-120.

Pichler, A., Knipscheer, P., Saitoh, H., Sixma, T.K., and Melchior, F. (2004). The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nat Struct Mol Biol* 11, 984-991.

Pickart, C.M. (2000). Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 25, 544-548.

Prudden, J., Pebernard, S., Raffa, G., Slavin, D.A., Perry, J.J., Tainer, J.A., McGowan, C.H., and Boddy, M.N. (2007). SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. *EMBO J* 26, 4089-4101.

Quignon, F., De Bels, F., Koken, M., Feunteun, J., Ameisen, J.C., and de The, H. (1998). PML induces a novel caspase-independent death process. *Nat Genet* 20, 259-265.

Quimby, B.B., Yong-Gonzalez, V., Anan, T., Strunnikov, A.V., and Dasso, M. (2006). The promyelocytic leukemia protein stimulates SUMO conjugation in yeast. *Oncogene* 25, 2999-3005.

Rego, E.M., Wang, Z.G., Peruzzi, D., He, L.Z., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) protein in tumor suppression. *J Exp Med* 193, 521-529.

Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., et al. (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* 20, 2140-2151.

Ritchie, K.J., and Zhang, D.E. (2004). ISG15: the immunological kin of ubiquitin. *Semin Cell Dev Biol* 15, 237-246.

Rocca, B., Morosetti, R., Habib, A., Maggiano, N., Zassadowski, F., Ciabattini, G., Chomienne, C., Papp, B., and Ranelletti, F.O. (2004). Cyclooxygenase-1, but not -2, is upregulated in NB4 leukemic cells and human primary promyelocytic blasts during differentiation. *Leukemia* 18, 1373-1379.

Rodriguez, M.S., Dargemont, C., and Hay, R.T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276, 12654-12659.

Rosas-Acosta, G., Langereis, M.A., Deyrieux, A., and Wilson, V.G. (2005). Proteins of the PIAS family enhance the sumoylation of the papillomavirus E1 protein. *Virology* 331, 190-203.

Ross, S., Best, J.L., Zon, L.I., and Gill, G. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* 10, 831-842.

Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., and Grosschedl, R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15, 3088-3103.

Saitoh, H., and Hinchev, J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275, 6252-6258.

Salomoni, P., Ferguson, B.J., Wyllie, A.H., and Rich, T. (2008). New insights into the role of PML in tumour suppression. *Cell Res* 18, 622-640.

Sampson, D.A., Wang, M., and Matunis, M.J. (2001). The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276, 21664-21669.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.

Scaglioni, P.P., Yung, T.M., Cai, L.F., Erdjument-Bromage, H., Kaufman, A.J., Singh, B., Teruya-Feldstein, J., Tempst, P., and Pandolfi, P.P. (2006). A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* 126, 269-283.

Schmidt, D., and Muller, S. (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 2872-2877.

Schwienhorst, I., Johnson, E.S., and Dohmen, R.J. (2000). SUMO conjugation and deconjugation. *Mol Gen Genet* *263*, 771-786.

Shao, W., Fanelli, M., Ferrara, F.F., Riccioni, R., Rosenauer, A., Davison, K., Lamph, W.W., Waxman, S., Pelicci, P.G., Lo Coco, F., et al. (1998). Arsenic trioxide as an inducer of apoptosis and loss of PML/RAR alpha protein in acute promyelocytic leukemia cells. *J Natl Cancer Inst* *90*, 124-133.

Shen, T.H., Lin, H.K., Scaglioni, P.P., Yung, T.M., and Pandolfi, P.P. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell* *24*, 331-339.

Shen, Z., Pardington-Purtymun, P.E., Comeaux, J.C., Moyzis, R.K., and Chen, D.J. (1996). UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* *36*, 271-279.

Shiels, C., Islam, S.A., Vatcheva, R., Sasieni, P., Sternberg, M.J., Freemont, P.S., and Sheer, D. (2001). PML bodies associate specifically with the MHC gene cluster in interphase nuclei. *J Cell Sci* *114*, 3705-3716.

Sobko, A., Ma, H., and Firtel, R.A. (2002). Regulated SUMOylation and ubiquitination of DdMEK1 is required for proper chemotaxis. *Dev Cell* *2*, 745-756.

Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G., and Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 14373-14378.

Song, J., Zhang, Z., Hu, W., and Chen, Y. (2005). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation. *J Biol Chem* *280*, 40122-40129.

Song, M.S., Salmena, L., Carracedo, A., Egia, A., Lo-Coco, F., Teruya-Feldstein, J., and Pandolfi, P.P. (2008). The deubiquitinylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network. *Nature*.

Spector, D.L. (2001). Nuclear domains. *J Cell Sci* *114*, 2891-2893.

Stadler, M., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M.H., Venturini, L., Lee, C., Saib, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemain, M.C., Schindler, C., et al. (1995). Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* *11*, 2565-2573.

Sun, H., Leverson, J.D., and Hunter, T. (2007). Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *EMBO J* *26*, 4102-4112.

Suzuki, K., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2004). Interrelationships among Atg proteins during autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *21*, 1057-1065.

Tatham, M.H., Geoffroy, M.C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E.G., Palvimo, J.J., and Hay, R.T. (2008). RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol* 10, 538-546.

Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H., and Hay, R.T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276, 35368-35374.

Terris, B., Baldin, V., Dubois, S., Degott, C., Flejou, J.F., Henin, D., and Dejean, A. (1995). PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Res* 55, 1590-1597.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.

Uchida, D., Hatakeyama, S., Matsushima, A., Han, H., Ishido, S., Hotta, H., Kudoh, J., Shimizu, N., Doucas, V., Nakayama, K.I., et al. (2004). AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase. *J Exp Med* 199, 167-172.

Uchimura, Y., Nakamura, M., Sugasawa, K., Nakao, M., and Saitoh, H. (2004). Overproduction of eukaryotic SUMO-1- and SUMO-2-conjugated proteins in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 331, 204-206.

Urano, T., Saito, T., Tsukui, T., Fujita, M., Hosoi, T., Muramatsu, M., Ouchi, Y., and Inoue, S. (2002). Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 417, 871-875.

Uzunova, K., Gottsche, K., Miteva, M., Weisshaar, S.R., Glanemann, C., Schnellhardt, M., Niessen, M., Scheel, H., Hofmann, K., Johnson, E.S., et al. (2007). Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates. *J Biol Chem* 282, 34167-34175.

Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* 4, 137-142.

Vichi, A., Payne, D.M., Pacheco-Rodriguez, G., Moss, J., and Vaughan, M. (2005). E3 ubiquitin ligase activity of the trifunctional ARD1 (ADP-ribosylation factor domain protein 1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1945-1950.

vom Baur, E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M.J., Garnier, J.M., Vivat, V., Le Douarin, B., Gronemeyer, H., Chambon, P., and Losson, R. (1996). Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J* 15, 110-124.

Wang, Z.Y., and Chen, Z. (2008). Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 111, 2505-2515.

Weidtkamp-Peters, S., Lenser, T., Negorev, D., Gerstner, N., Hofmann, T.G., Schwanitz, G., Hoischen, C., Maul, G., Dittrich, P., and Hemmerich, P. (2008). Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies. *J Cell Sci* 121, 2731-2743.

Weiner, M.P., Anderson, C., Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B., and, and Vaillancourt, P. (1994). *Strategies* 7, 41-43.

Weisshaar, S.R., Keusekotten, K., Krause, A., Horst, C., Springer, H.M., Gottsche, K., Dohmen, R.J., and Praefcke, G.J. (2008). Arsenic trioxide stimulates SUMO-2/3 modification leading to RNF4-dependent proteolytic targeting of PML. *FEBS Lett.*

Windheim, M., Lang, C., Peggie, M., Plater, L.A., and Cohen, P. (2007). Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *Biochem J* 404, 179-190.

Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17, 3469-3478.

Wu, J., Matunis, M.J., Kraemer, D., Blobel, G., and Coutavas, E. (1995). Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J Biol Chem* 270, 14209-14213.

Wu, W.S., Vallian, S., Seto, E., Yang, W.M., Edmondson, D., Roth, S., and Chang, K.S. (2001). The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases. *Mol Cell Biol* 21, 2259-2268.

Xie, Y., Kerscher, O., Kroetz, M.B., McConchie, H.F., Sung, P., and Hochstrasser, M. (2007). The yeast Hex3.Slx8 heterodimer is a ubiquitin ligase stimulated by substrate sumoylation. *J Biol Chem* 282, 34176-34184.

Yamaguchi, T., Sharma, P., Athanasiou, M., Kumar, A., Yamada, S., and Kuehn, M.R. (2005). Mutation of SENP1/SuPr-2 reveals an essential role for desumoylation in mouse development. *Mol Cell Biol* 25, 5171-5182.

Zhang, H., Saitoh, H., and Matunis, M.J. (2002). Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* 22, 6498-6508.

Zhang, R., Poustovoitov, M.V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., et al. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8, 19-30.

Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A., and Pandolfi, P.P. (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95, 2748-2752.

Zhou, G.B., Zhao, W.L., Wang, Z.Y., Chen, S.J., and Chen, Z. (2005). Retinoic acid and arsenic for treating acute promyelocytic leukemia. *PLoS Med* 2, e12.

Zhu, J., Gianni, M., Kopf, E., Honore, N., Chelbi-Alix, M., Koken, M., Quignon, F., Rochette-Egly, C., and de The, H. (1999a). Retinoic acid induces proteasome-dependent

degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14807-14812.

Zhu, J., Guo, W.M., Yao, Y.Y., Zhao, W.L., Pan, L., Cai, X., Ju, B., Sun, G.L., Wang, H.L., Chen, S.J., et al. (1999b). Tissue factors on acute promyelocytic leukemia and endothelial cells are differently regulated by retinoic acid, arsenic trioxide and chemotherapeutic agents. *Leukemia* 13, 1062-1070.

Zhu, J., Lallemand-Breitenbach, V., and de The, H. (2001). Pathways of retinoic acid- or arsenic trioxide-induced PML/RARalpha catabolism, role of oncogene degradation in disease remission. *Oncogene* 20, 7257-7265.

6 Abkürzungsverzeichniss

Allgemeine Abkürzungen

aa	Aminosäuren (engl.: amino acids)
Abb.	Abbildung
AOS1	engl.: <i>activation of Sentrin/SUMO protein</i>
APL	Akute promyelozytische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
ATO	Arsentrioxid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B1/B2	B-Box 1/B-Box 2
BSA	Albumin aus Rinderserum (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
C- / c-	Carboxy- / carboxy-
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
CMV _P	Cytomegalovirus-Promotor
ddNTP	2', 3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMEM	engl.: <i>Dulbecco's modified Eagles medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Ubiquitin / SUMO aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin / SUMO konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin / SUMO Ligase
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)-N,N'-tetracetat
EMEM	engl.: <i>Earl's modified Eagles medium</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FPLC	engl.: <i>fast performance liquid chromatography</i>
GST	Glutathion-S-Transferase

HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)piperazino]-ethansulfonsäure
Hex3	engl.: <i>hexose metabolism-related protein</i>
His-	Hexahistidin, in Zusammenhang mit Fusionsproteinen
IFN γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LICs	Leukämie initiierenden Zellen
M	molar (Mol / l)
MAPPs	engl.: <i>mitotic accumulations of PML protein</i>
MCS	multiple Klonierungsstelle (engl.: <i>multiple cloning site</i>)
N- / n-	Amino- / amino-
NEM	N-Ethylmaleimid
OH	Hydroxy
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PEFA	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid·Hydrochlorid
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PML	Promyelozytische Leukämie Protein
PML-NBs	PML-Kernkörper (engl.: <i>PML nuclear bodies</i>)
PML RBI	PML RING B1 (aa 49-179)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAR α	Retinsäure Rezeptor α
RING	engl.: <i>really interesting new gene</i>
RIPA	engl.: radioimmune precipitation assay
Ris1	engl.: <i>ras induced senescence 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNAi	interferierende RNA (engl.: RNA interference)
RNase	Ribonuklease
RNF4	RING Finger Protein 4
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: Sodiumdodecylsulfat)

SENP	engl.: <i>sentrin/SUMO-specific protease</i>
Slx8	engl.: <i>synthetic lethal of unknown [x] functi</i>)
SUMO	engl.: <i>small Ubiquitin like modifier</i>
TAE	Tris / Acetat / EDTA
TE	Tris / EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	engl.: <i>tabacco etch virus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton	X100 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglykol
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaureat
U/min	Umdrehungen pro Minute
UBA2	engl.: <i>putative ubiquitin-associated protein</i>
UBC9	engl.: <i>ubiquitin conjugating enzyme</i>
ULS	Ubiquitin Ligase für SUMO-Konjugate
UPS	Ubiquitin/Proteasom-System
USP	Ubiquitin spezifische Protease
UV	Ultraviolett
<i>wt</i>	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen (engl.: <i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)

Präfixe

c-	Centi-
k-	Kilo-
m-	Milli-
μ-	Mikro-
n-	Nano-
p-	Piko-

Physikalische Größen

A	Ampere
g	Erdbeschleunigung (im Kontext von Zentrifugation)
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter

m	Meter
min	Minute
OD	optische Dichte
sec	Sekunde (engl.: <i>seconds</i>)
V	Volt

Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
x		beliebig
Ψ		aliphatisch

7 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gerrit Praefcke für die Möglichkeit, als erster Doktorand in einer neu gegründeten Arbeitsgruppe an deren Aufbau beteiligt gewesen zu sein. Die Bereitstellung eines spannenden hochaktuellen Themas. Die immerwährende Bereitschaft, wertvolle Anregungen zu geben und fruchtbare Diskussionen im Verlauf der letzten Jahre zu führen, machten diese Arbeit erst möglich.

Herrn Prof. Dr. Thomas Langer danke ich sehr für die Bereitschaft mein Promotionsbetreuer zu sein.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Dohmen danke ich zum einen für die Übernahme des Koreferats und zum anderen für Möglichkeit mit ihm und seiner Arbeitsgruppe zusammen an diesem Projekt gearbeitet zu haben und mir immer die Möglichkeit für wertvolle Diskussionen gegeben zu haben.

Herrn Prof. Dr. Guenter Schwarz möchte ich ganz besonders für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission danken.

All den Mädels der Arbeitsgruppe Praefcke danke ich für unvergessliche Jahre. Christiane Horst danke ich für die Unterstützung bei der Laborarbeit und die vielen Gespräche die wir führten, seit Anbeginn dieser kleinen, aber feinen Nachwuchsgruppe. Veronika Bade danke ich für die Bereitstellung von E1- und E2- Enzymen. Julia Fres danke ich dafür, dass sie mir gezeigt hat, dass so ein kleines Labor auch Spaß machen kann. Helen Springer danke ich, dass sie sich zu uns verirrt hat. Ein großer Dank gilt Kirstin Keusekotten und Anke Krause für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Julia Hunn danke ich stellvertretend für so viele von der 2. Etage aus allen AGs (Dohmen, Langer und Howard), weil Ihr mir alle den täglichen Gang ins Labor in einer tollen Atmosphäre erleichtert habt!

Ein vorletzter Dank geht an meine Eltern und meine Geschwister für ihre uneingeschränkte Unterstützung.

Maren, ohne Dich und Deine Unterstützung in allen Lebenslagen wäre ich nicht der, der ich heute bin. Von tiefstem Herzen danke ich Dir.

8 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Thomas Langer betreut worden.

Köln, September 2008

Stefan Weißhaar

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

K. Uzunova, K. Gottsche, M. Miteva, S.R. Weisshaar, C. Glanemann, M. Schnellhardt, M. Niessen, H. Scheel, K. Hofmann, E.S. Johnson, G.J. Praefcke, R.J. Dohmen (2007) "Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates." J Biol Chem **282**(47): 34167-75.

S. Weisshaar, K. Keusekotten, A. Krause, C. Horst, H. Springer, K. Götsche, R. Dohmen, G. Praefcke (2008). "Arsenic trioxide stimulates SUMO-2/3 modification leading to RNF4-dependent proteolytic targeting of PML." FEBS Letters **582**(21–22): 3174-78

9 Lebenslauf

Curriculum Vitae

Dipl. Biol. Stefan Weißhaar

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Stefan Rene Weißhaar
Geboren: 03.03.1977 in Bergisch Gladbach
Adresse (privat): Odinweg 29, 51429 Bergisch Gladbach, Deutschland
Familienstand: Verheiratet
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Eltern: Frank Weißhaar und Christel Weißhaar, geb. Schuster

AUSBILDUNG

1983- 1987	Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Moitzfeld
1987- 1996	Besuch des Gymnasium Herkenrath mit abgeschlossener Fachhochschulreife
1996- 1997	Zivildienst an der Friedrich-Froebel-Schule, einer Schule für Geistigbehinderte
seit dem WS 1997	Studium des Faches Biologie auf Diplom an der Universität Köln
im SS 2000	Vordiplom (Abschluss des Grundstudiums)
im Dezember 2002	mündliche Diplom-Hauptprüfungen in folgenden Fächern : Hauptfach: Genetik 1. Nebenfach: Biochemie 2. Nebenfach: Organische Chemie
2003	Forschungsarbeit für die Diplomarbeit unter der Aufsicht von Professor Jonathan C. Howard im Institut für Genetik der Universität Köln, Abteilung Zellgenetik
im Januar 2004	Einreichung der schriftlichen Diplomarbeit mit dem Titel „RNA-Interferenz (RNAi) vermittelte Regulierung der Expression von IFN- γ stimulierten p47-GTPasen in Maus-Zell-Linien“
seit Juni 2004	Beginn der Doktorarbeit in der ZMMK Nachwuchsgruppe von Dr. Gerrit Praefcke zum Thema „Proteolytische Kontrolle des Proteins der promyelozytischen Leukämie (PML) durch Modifikation mit dem Ubiquitin-verwandten Protein SUMO“